



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/52, C12Q 1/68, 1/02, G01N</b> <b>33/53, 33/566, A61K 38/43</b>		<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/40202</b>
		<b>(43) 国際公開日</b>	<b>1999年8月12日(12.08.99)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> <b>PCT/JP99/00422</b>		<b>長谷川浩(HASEGAWA, Ko)[JP/JP]</b> 〒532-0036 大阪府大阪市淀川区三津屋中1丁目5番9号 Osaka, (JP)	
<b>(22) 国際出願日</b> <b>1999年2月2日(02.02.99)</b>		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 津国 肇(TSUKUNI, Hajime) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目22番12号 SVAX TSビル Tokyo, (JP)	
<b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/26003 1998年2月6日(06.02.98) JP 特願平10/309316 1998年10月30日(30.10.98) JP			
<b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 田辺製薬株式会社(TANABE SEIYAKU CO., LTD.)(JP/JP) 〒541-8505 大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号 Osaka, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
<b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 杉田尚久(SUGITA, Takahisa)[JP/JP] 〒631-0006 奈良県奈良市西登美ヶ丘3丁目3番9号 Nara, (JP) 櫻井宏明(SAKURAI, Hiroaki)[JP/JP] 〒669-1322 兵庫県三田市すすかけ台4丁目6番地 3番館602号 Hyogo, (JP) 陰山法子(KAGEYAMA, Noriko)[JP/JP] 〒319-1225 茨城県日立市石名坂町1丁目19-4-301 Ibaraki, (JP)		添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54)Title: NF-kB ACTIVATION INHIBITORS TARGETING ON TAK1 AND METHOD FOR IDENTIFYING THE SAME</b>			
<b>(54)発明の名称</b> TAK1を標的とするNF-κB活性化抑制薬及びその同定方法			
<b>(57) Abstract</b> Nuclear factor kappa B (NF-kB) activation inhibitors focusing on a novel transfer molecule; preventives/remedies for autoimmune diseases, etc.; and novel methods for identifying or screening the same. A method for identifying or screening NF-kB activation inhibitors which involves the step of examining the effect of a test substance of modulating the function of TGF-β activated kinase 1 (TAK1); a method for identifying or screening remedies and/or preventives for autoimmune diseases or intractable diseases with inflammation which involves the step of examining the effect of a test substance of modulating the function of TAK1 in the NF-kB activation pathway; and novel NF-kB activation inhibitors, and remedies/preventives for autoimmune diseases, intractable diseases with inflammation, etc. which are screened or identified by the above methods.			

本発明者らは、ヒトのTAK1 cDNAの3つのアレル変異体 (variant) を単離し、さらに、これらを用いた研究の中で、ヒトTAK1をTAB1と共に発現増強 (over expression) させることにより、NF- $\kappa$ Bの活性化が起こることを見出した。またTAK1は、TAB1と相互作用するとともに、IKK (I $\kappa$ Bキナーゼ) 複合体と相互作用しその活性化に関与すること、さらに、キナーゼ活性を失った変異型のTAK1は、NF- $\kappa$ B活性化を阻害することを見出した。

これらの知見から、TAK1が、NF- $\kappa$ Bの活性化に至るシグナル伝達経路 (NF- $\kappa$ B活性化経路) の中の重要な伝達分子であり、TAK1の機能を抑制する薬物はNF- $\kappa$ Bの活性化抑制薬となり得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

#### 発明の開示

すなわち、本発明は、TAK1 (TGF- $\beta$  アクチベーターキナーゼ1) の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、NF- $\kappa$ B活性化抑制薬の同定方法又はスクリーニング方法である。

また、本発明は、NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び/又は予防薬の同定方法又はスクリーニング方法である。

さらに、本発明は、前記方法によって選択又は同定された新規なNF- $\kappa$ B活性化抑制薬、および、自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患などの治療薬・予防薬である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、マウスTAK1 (mTAK1) 及び3種のヒトTAK1 (hTAK1 a、hTAK1 b及びhTAK1 c) のアミノ酸配列の比較を示す図；

第2図は、ヒトTAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞のNF- $\kappa$ B活性化 (ゲルシフトアッセイにおけるNF- $\kappa$ Bの核移行) を示す電気泳動の結果を示した図；

第3図は、ヒトTAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞のNF- $\kappa$ B活性化 (レポーターアッセイにおけるルシフェラーゼ活性) を示した図；

第4図は、変異型ヒトTAK1を発現させた細胞におけるNF- $\kappa$ B活性化の抑制 (ゲルシフトアッセイ (A) 及びレポーターアッセイ (B) の結果) を示した図；

第5図は、ヒトTAK1を発現増強させた細胞から得たTAK1を含む免疫沈降画分の免疫プロットの結果 (細胞内でのTAK1とTAB1の相互作用

(57)要約

本発明は、新しい伝達分子に焦点をあてたニュークレオファクターカッパB (NF- $\kappa$ B) 活性化抑制薬、自己免疫疾患などの治療薬・予防薬、及び、それらの新規な同定方法及びスクリーニング方法を提供するものであり、

TGF- $\beta$  アクチベーターキナーゼ1 (TAK1) の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、NF- $\kappa$ B 活性化抑制薬の同定方法又はスクリーニング方法、NF- $\kappa$ B 活性化経路におけるTAK1の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬の同定方法又はスクリーニング方法、並びに、前記方法によって選択又は同定された新規なNF- $\kappa$ B 活性化抑制薬、および、自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患などの治療薬・予防薬が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		

## 明 細 書

TAK1を標的とするNF- $\kappa$ B活性化抑制薬及びその同定方法

## 5 技術分野

本発明は、NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) 活性化抑制薬、および自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬・予防薬に関する。また、それらの新規なスクリーニング方法及び同定方法に関する。

## 10 背景技術

転写因子の一つとして知られるNF- $\kappa$ Bは、炎症や免疫応答に関与する種々の遺伝子の転写調節において重要な役割を果たしている。通常、NF- $\kappa$ Bは、細胞質内では、制御タンパク質であるI $\kappa$ Bと結合した不活性な複合体として存在しているが、細胞に一定の刺激が与えられると、I $\kappa$ Bが修飾・分解を受け複合体からはずれることにより活性化される。このように活性化されたNF- $\kappa$ Bは、核内へ移行し、ゲノムDNA上の種々の遺伝子上流領域（エンハンサー領域）に存在する特異塩基配列（約10塩基からなるNF- $\kappa$ B結合配列）と結合して、遺伝子の転写を活性化する。NF- $\kappa$ B結合配列は、免疫グロブリン遺伝子の他、IL-1、腫瘍壊死因子などの炎症性サイトカイン、インターフェロン、細胞接着因子などの遺伝子上流領域にも存在し、NF- $\kappa$ Bは、これら遺伝子の発現誘導を介して、炎症や免疫応答に関っている。

NF- $\kappa$ Bは、自己免疫疾患や炎症性疾患の病態形成にも関っており、NF- $\kappa$ Bの活性化抑制作用を有する薬物は、自己免疫疾患（慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、ベーチェット病、結節性動脈周囲炎、潰瘍性大腸炎、糸球体腎炎など）、炎症症状を呈する難治性疾患（変形性関節症、アテローム硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎など）、各種ウイルス性疾患、エンドトキシンショック、敗血症などの疾患の治療及び予防に効果を示すことが知られている。そして、これら疾患の治療・予防薬開発のために、新規なNF- $\kappa$ Bの活性化抑制薬の探索研究が進められている（Koppら、Science、第265巻、第956頁、1994年；Baeuerleら、Advances in Immunology 第65巻、第111～137頁、1997年；特開平7-291859号；及び特開平9-227561号）。

従来のNF- $\kappa$ B活性化抑制薬の探索研究においては、薬物のスクリーニング方法あるいは同定方法として、インビトロで細胞を刺激の存在下（もしくは非存在下）、被験薬物の存在下もしくは非存在下に培養し、NF- $\kappa$ Bの活性化を検出する方法が一般に用いられている。

しかしながら、細胞が一定の刺激（シグナル）を受けてから、NF- $\kappa$ Bの活性化に至るまでのシグナル伝達経路には、プロテインキナーゼなどの各種伝達分子が関わる多くのステップの存在が考えられる。従って、より効率的な創薬研究のためには、主要な役割を果たす伝達分子を明らかにした上で、それらに焦点を

5 しぼった新しい薬物スクリーニング方法を確立することが望まれる。しかし、NF- $\kappa$ Bの活性化のメカニズムは、幾つかの伝達因子（TRAF2（TNF- $\alpha$  receptor associated factor 2）、MAPKKK（mitogen-activated protein kinase kinase kinase）の一つであるNIK（NF- $\kappa$ B-inducing kinase）、IKKキナーゼ（IKK）、ユビキチン共役酵素、26Sプロテオソームなど）

10 が同定されるなど、少しずつ解明されつつあるものの（Nikolaiら、Nature、第385巻、第540～544頁；Maniatis、Science、第278巻、第818～819頁、1997年；Baeuerleら、Advances in Immunology 第65巻、第111～137頁、1997年）、いまだ不明な点が多く、より進んだメカニズムの解明と新しい伝達分子に焦点をあてたスクリーニング方法が望まれていた。

15 一方、TGF- $\beta$ アクチベータードキナーゼ1（Transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1；「TAK1」とも称する）は、哺乳動物のMAPKKKの一つとして見出されたものである（Yamaguchiら、Science、第270巻、第2008～2011頁、1995年；特開平9-163990）。TAK1は、TGF- $\beta$ （transforming growth factor- $\beta$ ）によって制御されるPAI-1プロモータを

20 活性化する。また、その命名の由来ともなっているようにTGF- $\beta$ によって活性化を受けることから、TGF- $\beta$ スーパーファミリーのメンバーによるシグナルの細胞内伝達経路において作用していると考えられてきた。

また、TAK1は、TAK1結合蛋白質1（TAK1 binding protein 1；「TAB1」とも称する）と結合（相互作用）することにより活性な形となり、シグナル伝達経路においてMAPKKKとして機能することが知られている（Shibuya

25 ら、Science、第272巻、第1179～1182頁、1996年）。しかしながら、TAK1とNF- $\kappa$ B活性化との関連については何ら知られていなかった。

本発明の目的は、新しい伝達分子に焦点をあてたNF- $\kappa$ B活性化抑制薬の同定方法およびスクリーニング方法を提供することにある。また、自己免疫疾患、

30 炎症症状を呈する難治性疾患などの治療薬・予防薬の新規な同定方法およびスクリーニング方法を提供することにある。

さらに、前記方法によって得られる新規なNF- $\kappa$ B活性化抑制薬、および自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患などの治療薬・予防薬を提供することにある。

用)を示した図;

第6図は、ヒトTAK1を発現増強させた細胞から得たTAK1を含む免疫沈降画分のキナーゼアッセイの結果(TAK1による自己リン酸化TAB1のリン酸化)を示した図;

- 5 第7図は、ヒトTAK1を発現増強させた細胞から得たTAK1を含む免疫沈降画分および細胞溶解液の免疫ブロッティングの結果(細胞内でのTAK1とIKKの相互作用)を示した図;

- 10 第8図は、ヒトTAK1を発現増強させた細胞から得たIKKを含む免疫沈降画分のIKKキナーゼアッセイの結果(TAK1によるIKK複合体の活性化)を示した図;及び

- 15 第9図は、NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機能を示した模式図(図中、TRAF2はTNF- $\alpha$ リセプター・アソシエーテッド・ファクター2を、IKKはIKKキナーゼを、NIKはNF- $\kappa$ Bインデュースング・キナーゼを、NEMOはNF- $\kappa$ Bエッセンシャル・モデュレーターを、IKAPはIKKコンプレックス・アソシエーテッド・プロテインを、それぞれ表わす)である。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 20 本発明において用いるTAK1は、いずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、モルモットなどの哺乳動物由来のものが挙げられる。これらのうち、ヒトの治療薬の研究開発に利用する上ではヒト由来のものを用いることが好ましい。

- 25 TAK1のcDNA配列およびアミノ酸配列はすでに報告されている(Genbank/EMBL データベース Accession No. D76446; Yamaguchiら、Science、第270巻、第2008~2011頁、1995年)。また、後記配列表の配列番号3、4及び5には、発明者らが新たに見出したヒトのTAK1 cDNAの3つのアレル変異体(variant)のDNA配列及びそれらにコードされるTAK1のアミノ酸配列を示した。

- 前記の通り、発明者らが独自に見出した知見によれば、TAK1は、NF- $\kappa$ B活性化経路において、主要な伝達分子として機能する。

- 30 TAK1は、細胞内でTAB1(TAK1結合蛋白質1)と相互作用(結合)することによって活性化され、プロテインキナーゼ活性(MAPKKK活性)を示す活性型となるが、この相互作用により自己リン化とTAB1のリン酸化を生じる。また、TAK1はIKK複合体とも機能的に相互作用する。活性化されたTAK1は、IKK複合体を活性化して、NF- $\kappa$ B活性化経路における伝達分子としての機能を発揮し、NF- $\kappa$ B活性化を誘導すると考えられる。
- 35

NF- $\kappa$ B 活性化経路における TAK1 の機能の模式図を第 9 図に示した。

本発明においては、上記のような TAK1 の機能（特に NF- $\kappa$ B の活性化経路における機能）に着目し、被験物質の作用（特に阻害又は抑制作用）を検定す

る。このような機能としては、より具体的には、例えば

(1) TAK1とTAB1との相互作用(結合)、

(2) TAK1のプロテインキナーゼ活性、

(3) 細胞内のTAK1によるIKK複合体の活性化、

5 (4) 細胞内のTAK1により誘導されるNF- $\kappa$ B活性化、

などが挙げられる。これらの機能に対する被験物質の作用を検定する方法を以下に述べる。

(1) TAK1とTAB1との相互作用(結合)に対する作用の検定

例えば、TAK1とTAB1との結合を直接検出する方法、共免疫沈降法(co-immunoprecipitation)法により検出する方法、あるいは、ツーハイブリッドシステム(two-hybrid system)(米国特許第5,283,173号、およびProc.Natl.Acad.Sci. USA、第88巻、第9578~9582頁、1991年)などの方法を用いることができる。

15 TAK1とTAB1との結合を検出する際には、TAK1及びTAB1としてはそれらの全体を用いてもよいが、少なくとも両者の結合に関与する領域を含む部分ポリペプチドを用いてもよい。あるいは、それらに適当なタグ標識(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、6×His、プロテインA、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトースバインディングプロテイン、フラッグ抗原、Xpress抗原、HA抗原、Myc抗原などの部分ポリペプチドなど)を付加した融合タン

20 バク質を用いてもよい。  
TAK1とTAB1との結合を直接検出する場合は、例えば、RIなどで標識したTAK1(もしくはTAB1)を用い、TAB1(もしくはTAK1)に必要なに応じて適当なタグ標識を付加した融合タンパク質との結合を、被験物質の存在下で直接的に検出する。

25 共免疫沈降法(co-immunoprecipitation)法による場合は、例えば、TAK1、TAB1、もしくはこれらに付加したタグ標識を認識する抗体を検出に用いる。まず、TAK1及びTAB1を発現している細胞から細胞溶解液を調製し、一方の蛋白質を認識する抗体を用いて細胞溶解液中のその蛋白質を免疫沈降させる。免疫沈降させた画分中に含まれるもう一方の蛋白質の存在を、免疫ブロッティングなどの方法により検出することにより、細胞内での両蛋白質の相互作用(結

30 合)を検出できる。  
また、ツーハイブリッドシステムは、レポーター遺伝子の発現をマーカーとする方法である(米国特許第5283173号、およびProc.Natl.Acad.Sci. USA、第88巻、第9578~9582頁、1991年)。

35 ツーハイブリッドシステムを利用する場合、具体的には、例えば、(i)転写



因子の第一領域（DNA結合領域又は転写活性化領域）とTAK1からなる第一の融合蛋白質をコードする遺伝子、（ii）転写因子の第二領域（転写活性化領域又はDNA結合領域）とTAB1からなる第二の融合蛋白質をコードする遺伝子、及び（iii）転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列およびその下流に連結されたレポーター遺伝子、を含む試験用細胞を用い、これを被験物質と共存させてインキュベートし、レポーター遺伝子の発現を指標として、TAK1とTAB1の結合に対する被験物質の作用を検定する。被験物質がTAK1とTAB1の結合を阻害する場合には、被験物質の存在によってレポーター活性の減少が認められる。

- 5 10 第一及び第二の融合蛋白質をコードする遺伝子は通常の遺伝子組換え技術を用いて、設計し構築することができる。

宿主細胞は、例えば、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳動物細胞などが挙げられる。これらのうち、酵母細胞は培養が容易で迅速に実施できる上、外来遺伝子の導入など遺伝子組換え技術を適用するのが容易である点で有利である。

- 15 転写因子は、宿主細胞内で機能するものであればよく、例えば、酵母のGAL4蛋白質（Keeganら、Science、第231巻、第699～704頁、1986年、Maら、Cell、第48巻、第847～853頁、1987年）、GCN4蛋白質（Hopeら、Cell、第46巻、第885～894頁、1986年）、ADR1蛋白質（Thukralら、Molecular and Cellular Biology、第9巻、第2360～2369頁、1989年）などが挙げられる。

- 20 応答配列は、転写因子に対応した応答配列を用いればよく、例えば、転写因子としてGAL4を用いる場合、応答配列としては、UASg（ガラクトース代謝遺伝子の上流域活性化部位：upstream activation site of galactose genes）と称されるGAL4特異的なDNA配列を用いることができる。

- 25 レポーター遺伝子も、特に限定されない。例えば、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（CAT）、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子（Luc）など、安定でかつ活性の定量的測定が容易な酵素の遺伝子などを好適に用いることができる。

（2）TAK1のプロテインキナーゼ活性に対する作用の検定

- 30 例えば、基質蛋白質を含む溶液に、TAK1及びTAB1を含む溶液、及び、ATP（必要に応じてRIなどで標識したもの）を含む溶液を添加し、被験物質の存在下もしくは非存在下で酵素反応を行い、基質蛋白質へのリン酸の取込みなどを指標としてプロテインキナーゼ活性を測定し、被験物質の作用を検定する。

- 35 TAK1及びTAB1は、遺伝子組換え技術により適当な宿主細胞（酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳動物細胞など）で発現させたものなどを用いることができる。

また、TAK1のN末端領域がTAB1との結合に関与しており、N末端（N末端側22アミノ酸）が欠失したTAK1は、TAB1と結合しない場合にも活性型のシグナル伝達分子として作用することが知られている（Yamaguchiら、及び Shibuyaら）ので、TAK1とTAB1の両者を用いる代わりに、N末端が欠失

5 しTAB1非依存的に活性を示す活性変異型TAK1を用いてもよい。

基質蛋白質としては、TAK1自体、TAB1、もしくはそれらの部分ペプチドを用いることができる。また、IKK及びIKK複合体と機能的に相互作用する分子又はそれらの部分ペプチドもまた基質蛋白質として用いることができる。

この他、アフリカツメガエルのXMEK2（SEK1）（Shibuyaら、Science、第272巻、第1179～1182頁、1996年）、ヒトMKK3（Derijardら、Science、第267巻、第682～685頁、1995年）、ヒトMKK6（MAPKK6）

10

（Raingeaudら、Molecular and Cellular Biology、第16巻、第1247～1255頁、1996年；Moriguchiら、Journal of Biological Chemistry、第271巻、第13675～13679頁、1996年）などのMAPKK（mitogen activated protein kinase

15 kinase）やそれらの部分ペプチドを基質として用いることもできる。基質としてMAPKKを用いる場合には、MAPKKの活性化（MAPK（mitogen-activated protein kinase）に対するリン酸化活性の増大）を指標としてTAK1のプロテインキナーゼ活性を測定することもできる。

（3）細胞内のTAK1によるIKK複合体活性化に対する作用の検定

例えば、TAK1（より詳細には活性型のTAK1）を発現増強（over

20 expression）させた細胞を試験用細胞として用いる。このような試験用細胞としては、TAK1及びTAB1を共に発現増強した細胞が挙げられ、TAK1及びTAB1の発現用ベクターを適当な宿主細胞中に導入することにより得られる。或いは、N末端が欠失しTAB1非依存的に活性を示す活性変異型TAK1を発

25 現増強させた細胞を用いてもよい。

前記試験用細胞を、例えば、被験物質の存在下又は非存在下に培養する。培養後の細胞から、IKK複合体を含む画分を免疫沈降などにより取得し、これを用いてIKKキナーゼ反応を行い、IKK複合体の活性化を測定して、被験物質の作用を検定する。

（4）細胞内のTAK1により誘導されるNF- $\kappa$ B活性化に対する作用の検定

30

例えば、前記（3）と同様、活性型TAK1の発現増強細胞を試験用細胞として用い、これを被験物質の存在下又は非存在下に培養する。NF- $\kappa$ B活性化をゲルシフトアッセイなどにより検出して、被験物質の作用を検定する。

35 活性型TAK1の発現増強細胞は、コントロール細胞（ベクターのみを導入し

た細胞など)と比較するとシグナル伝達分子として働くTAK1の発現量が増加している。従って、TAK1に作用する被験薬物を選択したい場合の試験細胞として好適である。例えば、活性型TAK1を発現増強させた細胞及びコントロール細胞の両者において、被験物質の存在によりNF- $\kappa$ B活性化抑制作用が認められた場合には、該被験物質の作用点はTAK1にある可能性が高いと判断される。

前記(1)～(4)の方法において、試験に用いる細胞としては、ヒトなどの哺乳動物由来の細胞株を好適に使用でき、例えば、ヒトHeLa細胞、ヒトJurkat細胞、ヒトTHP-1細胞、サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞などが挙げられ、このうち、ヒトHeLa細胞、ヒトJurkat細胞、ヒトTHP-1細胞などが好ましい。

前記(1)～(4)の方法において、TAK1、TAB1、もしくはこれらの融合蛋白質などを発現増強させる場合、既知の配列情報と通常の遺伝子組換え技術を用いて行うことができる。

TAK1の配列情報は、前記の通りであり、TAB1のcDNA配列およびアミノ酸配列もまた報告されている(Genbank/EMBL データベース Accession No. U49928; Shibuyaら、Science、第272巻、第1179～1182頁、1996年)。TAB1は、いずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、サル、モルモットなどの哺乳動物由来のものが挙げられる。これらのうち、ヒトの治療薬の研究開発に利用する上ではヒト由来のものを用いることが好ましい。

TAK1、TAB1などのcDNAあるいは遺伝子は、既知のアミノ酸配列や塩基配列の情報などをもとに設計し合成したプライマーやプローブを用い、通常のPCR(Polymerase Chain Reaction)法やRT-PCR法、あるいはDNAライブラリからのスクリーニングにより単離することができる。これらを適当なベクターに組み込んで発現用ベクターを構築できる。

ベクターとしては、適当なプロモーター(例えば、CMVプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーション1 $\alpha$ プロモーターなど)を含む動物細胞用のベクター(例えば、レトロウイルス系ベクター、パピロマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクターなど)を使用できる。

前記(1)～(4)のような検定方法により、TAK1の機能に対する阻害作用や抑制作用が認められた被験物質については、さらにNF- $\kappa$ B活性化に対する抑制作用を確認すればよい。あるいは、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の既知の病態モデル(in vitro又はin vivo)において治療及び/又は予

防効果を確認すればよい。

NF- $\kappa$ B活性化は、既知のゲルシフトアッセイ法 (Sakuraiら、*Journal of Neurochemistry* 第59巻、第2067～2075頁、1992年；Sakuraiら、*Biochimica Biophysica Acta*、第1316巻、第132～138頁、1996年)、レポーターアッセイ法 (Tanakaら、*Journal of Veterinary Medical Science*、第59巻、第575～579頁、1997年；EP-652290-A；特開平7-291859号；特開平9-227561号) などにより調べることができる。

自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の既知の病態モデル (in vitro又はin vivo) としては、ヒトT細胞株 (Jurkat細胞) を用いるPHA誘発IL-2産生モデル (Wacholtzら、*Cell Immunology*、第135巻、第285～298頁、1991年)、ヒトマクロファージ系細胞RAW264.7を用いるLPS+IFN- $\gamma$ 誘発iNOS産生モデル (Xieら、*Science*、第256巻、第225～228頁、1992年) 及びヒトHeLa細胞を用いるTNF- $\alpha$ 誘発IL-6産生モデルなどのin vitroモデル、ラットアジュバント関節炎モデル (Connorら、*European Journal of Pharmacology*、第273巻、第15～24頁、1995年)、トリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎モデル (Kissら、*European Journal of Pharmacology*、第336巻、第219～224頁、1997年) 及びラット馬杉腎炎モデル (Sakuraiら、*Biochimica Biophysica Acta*、第1316巻、第132～138頁、1996年) などのin vivoモデルなどが挙げられる。

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (Molecular Cloning)」 (Sambrook, J., Fritsch, E.F.及びManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊) に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

## 実施例

### 実施例1 ヒトTAK1及びTAB1のcDNA単離

#### (1) ヒトTAK1のcDNA単離

ヒト子宮けい癌由来細胞株HeLa (ATCC CCL2) からポリ(A) RNAを調製した。これを鋳型とし、オリゴdTプライマーを用いて一本鎖cDNAを調製した。

前記で得られた一本鎖cDNAを鋳型とし、PCR (polymerase chain reaction) 法により、ヒトTAK1のcDNA断片を取得した。PCRに用いる

プライマーは、マウスTAK1のcDNA配列（Genbank/EMBL データベース Accession No. D76446；Yamaguchiら、Science、第270巻、第2008～2011頁、1995年）を参考にして設計し、DNA合成機で合成した。センスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列（10塩基）及びマウスTAK1 cDNAの翻訳開始コドンとその下流の配列（20塩基）からなる30マーの合成プライマー（後記配列表の配列番号1）を用い、アンチセンスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列（10塩基）及びマウスTAK1 cDNAの終止コドンとその上流の相補配列（20塩基）からなる30マーの合成プライマー（後記配列表の配列番号2）を用いた。

前記PCRで得られた産物（約1.7 kbのcDNA断片の混合物）をプローブとし、ヒト肺cDNAライブラリー（Clontech社製）をスクリーニングすることにより、2種のヒトTAK1の全コーディング領域を含むcDNA（hTAK1 a-cDNA及びhTAK1 b-cDNA）を取得した。

また、前記と同様にして調製したHeLaのmRNAを鋳型とし、RT-PCR（Reverse transcript - polymerase chain reaction）法により、別途、ヒトTAK1の全コーディング領域を含むcDNA（hTAK1 c-cDNA）を得た。プライマーとしては、前記と同様の合成プライマーを用いた。

得られた3種のcDNAについて、ダイデオキシ法により、そのDNA配列を決定した。各cDNA（hTAK1 a-cDNA、hTAK1 b-cDNA及びhTAK1 c-cDNA）について、そのコーディング領域を含む領域のDNA配列およびそれらにコードされるヒトTAK1（hTAK1 a、hTAK1 b及びhTAK1 c）のアミノ酸配列を、後記配列表の配列番号3、配列番号4、及び配列番号5に示した。

hTAK1 a、hTAK1 b及びhTAK1 cのcDNA配列は、マウスTAK1のcDNA配列と比較すると、コーディング領域における相同性は、各々91.7%、87.6%及び86.8%であった。

hTAK1 aは、579アミノ酸残基からなる。マウスTAK1と比較すると4アミノ酸の置換が見られ、アミノ酸配列における相同性は99.3%であった。

hTAK1 bは、606アミノ酸残基からなり、hTAK1 aと比較するとC末端側にスプライシング変異によって生じたと思われる27アミノ酸の挿入が見られる。また、hTAK1 cは、567アミノ酸残基からなり、hTAK1 aと比較すると、hTAK1 bと同様C末端に27アミノ酸の挿入があり、さらにその下流（C末端側）に39アミノ酸の欠失が見られた。

3種のヒトTAK1およびマウスTAK1のアミノ酸配列の比較を、第1図に示した。

なお、特開平9-163990号の配列番号5に記載されたヒトT細胞株Jurkat由来のTAK1は、hTAK1aのアミノ酸配列と比較すると、1アミノ酸の置換（第372番目のArg→His）が見られ、アレル変異体と考えられる。

(2) ヒトTAB1のcDNA単離

- 5 前項(1)と同様にしてHeLaから調製したポリ(A)RNAを鋳型とし、RT-PCRによりヒトTAB1のcDNAを得た。プライマーは、報告されているヒトTAB1のcDNA配列（Genbank/EMBL データベース Accession No. U49928；Shibuyaら、Science、第272巻、第1179～1182頁、1996年）を参考にして設計し、DNA合成機で合成した。センスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列（10塩基）及びTAB1cDNAの翻訳開始コドンとその下流の配列（20塩基）からなる30マーの合成プライマー（後記配列表の配列番号6）を用い、アンチセンスプライマーとしては、制限酵素切断のための認識部位を含む配列（10塩基）及びTAB1cDNAの終止コドンとその上流の相補配列（20塩基）からなる30マーの合成プライマー（後記配列表の配列番号7）を用いた。
- 10  
15

得られたcDNA断片についてDNA配列を決定し、既知のヒトTAB1の全コーディング領域を含んでいることを確認した。

実施例2 TAK1の発現を増強させた細胞におけるNF- $\kappa$ B活性化の検出

- 20 (1) ヒトTAK1の発現を増強させた細胞の取得

前記実施例1の(1)において取得した3種のヒトTAK1cDNAを用い、そのコーディング領域を含む部分断片（hTAK1a-cDNAのEcoRI-NheI断片、hTAK1b-cDNAのEcoRI-NheI断片及びhTAK1c-cDNAのEcoRI-XbaI断片）の各々を、真核細胞発現用ベクタープラスミドp cDNA 3.

- 25 1 (+) (Invitrogen社製)のEcoRI-XbaI切断部位に組込んで、TAK1発現用組換えプラスミドを作製した。

- また、前記実施例1の(2)にて取得したヒトTAB1cDNAを用い、そのコーディング領域を含む部分断片（HindIII-EcoRI断片）を、発現用ベクタープラスミドp cDNA 3.1 (+)のHindIII-EcoRI切断部位に組込んで、TAB1発現用組換えプラスミドを作製した。
- 30

- 前記TAK1発現用組換えプラスミドを、TAB1発現用組換えプラスミドと共に、もしくは単独で、HeLa細胞にトランスフェクション（一過性トランスフェクション；transient transfection）した。この時、トランスフェクションは、トランスフェクション用カチオン性リポソーム（商品名：LipofectAMINE、Life Technologies社製）を用いて行った。
- 35

かくしてTAK1発現増強細胞もしくはTAK1-TAB1共発現増強細胞を得た。これら細胞の培養は、10%ウシ胎児血清、ペニシリン(100単位/ml)及びストレプトマイシン(100 $\mu$ g/ml)を添加した高グルコース含有ダルベッコイーグル培地(Gibco社製)中に行った。

5 (2) ゲルシフトアッセイ

前項(1)で得られたTAK1発現増強細胞およびTAK1-TAB1共発現増強細胞を用い、文献(Sakuraiら、Journal of Neurochemistry 第59巻、第2067~2075頁、1992年; Sakuraiら、Biochim. Biophys. Acta、第1316巻、第132~138頁、1996年)記載の方法に準じて、以下のようにゲルシフトアッセイを行っ  
10 た。すなわち、トランスフェクションの後、細胞を培養し24時間後に細胞から核抽出液を調製した。

この核抽出液(5 $\mu$ g)とRI標識した検出用プローブとを結合緩衝液(20mM HEPES (pH7.9), 0.3mM EDTA, 0.2mM EGTA, 80mM NaCl, 10% グリセロール, 2 $\mu$ g/ml poly[dI-dC])中、室温で30分間結合反応させた後、反応液について  
15 ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ゲルを減圧乾燥させた後、オートラジオグラフィーにてプローブと結合したNF- $\kappa$ Bを検出した。また、コントロールとしては、構成的に発現している転写因子であるOct-1 (Octamer-1) (Verrijzerら、Genes and Development、第4巻、第1964-1974頁、1990年)を検出した。

20 検出用プローブは、<sup>32</sup>Pで標識した二本鎖の合成DNAを用いた。NF- $\kappa$ B検出用プローブの配列としては、HIVのLTR (Long Terminal Repeat)に存在するNF- $\kappa$ B結合配列と同様のものを用いた。また、Oct-1検出用プローブの配列としては、コンセンサス配列AGCTAAATを含むオリゴヌクレオチドを用いた。

25 前記のようにして、ゲルシフトアッセイによりNF- $\kappa$ Bの核移行を指標としてNF- $\kappa$ B活性化を調べた結果、第2図に示した通り、ヒトTAK1 (hTAK1a、hTAK1b又はhTAK1c)をTAB1とともに発現増強させた場合には、NF- $\kappa$ Bの核への移行が見られ、NF- $\kappa$ Bの活性化が認められた。このような結果は、ヒトTAK1として、hTAK1a、hTAK1b及びhTAK1cのいずれを用いた場合にも認められたが、特にhTAK1bにおいて、  
30 NF- $\kappa$ Bの活性化が顕著であった。

一方、ヒトTAK1のみを発現増強させた細胞においては、NF- $\kappa$ Bの活性化が認められなかった。また、コントロール蛋白質として検出したOct-1は、TAK1及び/又はTAB1の発現増強には影響を受けず、恒常的に発現が見  
35 られた。

このように、ヒトTAK1の作用の増強に伴って、NF- $\kappa$ Bの活性化が観察されたことから、TAK1は、NF- $\kappa$ Bの活性化に至るまでのシグナル伝達経路において、伝達分子として主要な働きをしていることがわかった。

(3) レポーターアッセイ (ルシフェラーゼアッセイ)

- 5 田中らの文献 (Tanakaら、Journal of Veterinary Medical Science、第59巻、第575～579頁、1997年) 記載の方法に準じ、以下のようにしてレポーターアッセイ (ルシフェラーゼアッセイ) を行った。

まず、NF- $\kappa$ B 結合配列 (GGGGACTTCC) を4個連結したオリゴヌクレオチドを ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) の上流に組み込んで、レポーター  
10 プラスミド (p(kB)4-Luc) を作製した。

次に、前項 (1) 記載の方法に準じ、TAK1 発現用組換えプラスミドを、必要に応じてTAB1 発現用組換えプラスミドと共に、HeLa細胞にトランスフェクション (一過性トランスフェクション; transient transfection) した。但、トランスフェクションに際しては、前記で得られたレポータープラスミド (p(kB)  
15 4-Luc) を共に用いた。

かくしてレポータープラスミド及びTAK1 発現用組換えプラスミド (及びTAB1 発現用組換えプラスミド) を含むトランスフェクタントを得た。得られたトランスフェクタントを48時間培養した後、細胞を溶解して調製した抽出液について、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、ルシフェラー  
20 ゼアッセイキット、ピッカジーン (商品名、東洋インキ社製) 及び化学発光測定装置 (商品名: MicroLumant LB96P、ベルトールドジャパン株式会社製) を用いて測定した。

その結果、第3図に示した通り、ヒトTAK1 (hTAK1a、hTAK1b 又はhTAK1c) のみを発現増強させた細胞においては、ベクターのみを含む  
25 細胞と比較してルシフェラーゼ活性の増加 (すなわち、NF- $\kappa$ Bの活性化) はほとんど認められなかった。しかし、ヒトTAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞では、ベクターのみを含む細胞と比較して、ルシフェラーゼ活性の顕著な増加 (すなわち、NF- $\kappa$ Bの活性化) が認められた。

このように、前記のゲルシフトアッセイ法と同様、レポーターアッセイ法 (ルシフェラーゼアッセイ法) によっても、ヒトTAK1の作用の増強に伴って、NF- $\kappa$ Bの活性化が観察され、TAK1が伝達分子として主要な働きをしていることが確認された。

また、このようにTAK1 発現増強細胞とコントロール細胞を用いるレポーターアッセイの系により、被験薬物のTAK1に対する作用とNF- $\kappa$ B活性化に対する作用を同時に検定することができると考えられる。  
35



### 実施例3 ツーハイブリッドシステムを利用したTAK1とTAB1との結合 検出系

前記実施例1の(1)で得たヒトTAK1 cDNAの翻訳領域を切り出し、これを、転写因子GAL4のDNA結合領域(GAL4の1から147番目のアミノ酸残基)をコードするDNAを含む発現ベクターpGBT9(Clontech社製、酵母two-hybridシステム用ベクター)のマルチクローニング部位に挿入する。これにより、GAL4のDNA結合領域とヒトTAK1との融合タンパク質を発現するためのプラスミドpGBT9-TAK1を得る。

前記実施例1の(2)で得たヒトTAB cDNAの翻訳領域を切り出し、これを、GAL4の転写活性化領域(GAL4の768から881番目のアミノ酸残基)をコードするDNAを含む発現ベクターpGAD424(Clontech社製、酵母two-hybridシステム用ベクター)のマルチクローニング部位に挿入する。これにより、GAL4の転写活性化部位とTAB1との融合蛋白質を発現するためのプラスミドpGAD424-TAB1を得る。

前記で得られる融合蛋白質発現プラスミドpGBT9-TAK1及びpGAD424-TAB1を宿主酵母細胞株SFY526(Clontech社製)に導入する。細胞株SFY526は、GAL1とlacZの融合遺伝子が染色体に組込まれており、GAL4遺伝子の欠損変異を有している細胞株である(Bartelら、Bio Techniques、第14巻、第920~924頁、1993年)。形質転換は、それぞれのプラスミドの選択マーカーであるトリプトファン及びロイシンを欠乏させた合成培地にて培養することにより選別を行って、両プラスミドが導入された形質転換株を得る。

前記で得られる酵母形質転換株を、液体培地で培養する。培養の際、培地中には、被験物質を添加(もしくは無添加)する。4~5時間培養後、酵母菌体を遠心分離により回収し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として、TAK1とTAB1の結合(相互作用)を検出する。

被験物質の添加によって、濃度依存的に $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の減少が認められた場合には、その被験物質には、TAK1とTAB1の結合を阻害する作用を有すると考えられる。

### 実施例4 TAK1のMAPKKK活性の検出系

ヒトTAK1(又はN末端(22アミノ酸)が欠失したヒトTAK1)を、以下のようにして昆虫細胞の系で発現させ精製する。すなわち、前記実施例1の(1)で得たヒトTAK1 cDNAの翻訳領域を用い、タグペプチド(6×His又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ)を付加するために設計した適切なDNA配列を含むバキュロウイルス発現ベクターpAcHLT又はpAcGH

LT (ファーミンジェン社製) のマルチクローニング部位に挿入し、ヒトTAK1 発現プラスミドを得る。得られたプラスミドを宿主昆虫細胞SF21に導入し得られた形質転換細胞を培養して、タグペプチドが付加されたヒトTAK1 (又はN末端欠失ヒトTAK1) を発現させ、細胞抽出液から、付加したタグペプチドを利用するアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。

また、前記と同様にして、ヒトTAB1を昆虫細胞の系で発現させ精製する。

また、ヒトMKK3及びヒトMKK6を、以下のようにして発現させ精製する。

まず、モリグチ (Moriguchi) らの方法 (Journal of Biological Chemistry、第271巻、第13675~13679頁、1996年) に準じ、ヒトMKK3に関する配列情報

(Genbank/EMBL データベース Accession No.L36719; Derijardら、Science、第267巻、第682~685頁、1995年) 及びヒトMKK6に関する配列情報

(Genbank/EMBL データベース Accession No.U39656およびU39657;

Raingeaudら、Molecular and Cellular Biology、第16巻、第1247~1255頁、1996年) をもとにプライマーを設計し、これらを用いるPCR法により、ヒトM

KK3及びヒトMKK6の全翻訳領域を含むcDNA、又はTAK1によってリン酸化されるアミノ酸残基近傍の配列を含むcDNAを取得する。これらcDNAを用い、タグペプチド (6×His又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ) を付加するために設計した適切なDNA配列を含む大腸菌発現ベクターpQE-30 (QIAGEN社製) 又はpGEX-2T (ファルマシア社製) のマルチクローニング部位に挿入して、ヒトMKK3発現プラスミド及びヒトMKK6発現プラスミドを得る。得られるプラスミドを宿主大腸菌 (JM109株など) に導入し得られた形質転換細胞を培養して、タグペプチドが付加されたヒトMKK3及びヒトMKK6を各々発現させ、細胞抽出液から、付加したタグペプチドを利用するアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。

前記で得られるヒトTAK1 (又はN末端欠失ヒトTAK1) を必要に応じてヒトTAB1と組み合わせて酵素 (MAPKKK) として用い、ヒトMKK3もしくはヒトMKK6を基質として用いて、被験物質の存在下又は非存在下で酵素反応を行う。基質蛋白質は予めプレート上に固相化して用い、反応は<sup>32</sup>Pまたは<sup>33</sup>P標識ATP100μMを含むトリス緩衝液 (20mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM EGTA, 10mM MgCl<sub>2</sub>) 中30℃にて行う。酵素反応後、プレートを洗浄した後シンチレーションカウンターにて<sup>32</sup>Pまたは<sup>33</sup>P標識ATPの取込みを測定してすることにより、酵素活性を測定し、被験物質による阻害の有無を判定する。

#### 実施例5 変異型TAK1を発現させた細胞におけるNF-κB活性化の抑制

以下のようにして、キナーゼ活性を欠く変異型TAK1 (または野生型TAK

1) を発現増強させた細胞を用い、NF- $\kappa$ B活性化の有無を検出した。

(1) TAK1及びTAB1の発現ベクター構築とトランスフェクション

ベクタープラスミドpFLAG-CMV2は、フラッグ抗原のタグを付加した蛋白質を哺乳動物細胞中で発現させるためのベクターである。ヒトTAK1 (ヒトTAK1a) の全長cDNAを、pFLAG-CMV2 (Kodak社製) のEcoRI-XbaI制限酵素切断部位に組み込むことにより、フラッグ付加された野生型TAK1 (Flag-TAK1) の発現ベクターを得た。

また、変異導入用キット (商品名: QuickChange site-directed mutagenesis kit; Stratagene社製) を用い、前記Flag-TAK1発現ベクターのTAK1翻訳領域に変異導入して各種変異発現ベクターを取得し、塩基配列を決定した。かくしてフラッグ付加された変異型TAK1 (Flag-TAK1K63W) の発現ベクターを得た。この発現ベクターにより発現される変異型TAK1は、野生型TAK1の63番目のリジン残基がトリプトファン残基に置換されており、TAK1のキナーゼ活性を失っていた。

前記のフラッグ付加された野生型又は変異型TAK1 (Flag-TAK1又はFlag-TAK1K63W) の発現ベクターを、単独あるいはTAB1発現ベクターとともにHeLa細胞にトランスフェクションし、一過性に発現させた。また、コントロールとして、TAK1発現ベクターにかえてベクターのみを用いた。トランスフェクションは、リポフェクトアミン試薬 (Life Technologies社製) を用いて行い、TAB1の発現ベクターは前記実施例2(1)と同じものを用いた。

(2) ゲルシフトアッセイ

前記(1)で得た、フラッグ付加された変異型TAK1 (又は野生型TAK1) をTAB1とともに発現増強させた細胞を用い、実施例2(2)と同様にして、ゲルシフトアッセイを行った。

その結果、第4図の(A)に示した通り、ベクターのみ導入した細胞と比較して、野生型TAK1 (Flag-TAK1) をTAB1とともに発現増強させた細胞において、NF- $\kappa$ Bの核移行が増強され、NF- $\kappa$ B活性化が認められた。しかし、キナーゼ活性を欠く変異型TAK1 (Flag-TAK1K63W) の場合は、TAB1とともに発現させてもNF- $\kappa$ Bの核移行は増強されなかった。

(3) レポーターアッセイ (ルシフェラーゼアッセイ)

前記(1)で得た、変異型TAK1 (Flag-TAK1K63W) の発現ベクターをHeLa細胞にトランスフェクションした。但、トランスフェクションに用いるFlag-TAK1K63W発現ベクターの量は、0  $\mu$ g、0.03  $\mu$ g及び0.1  $\mu$ gの3種類とし、トータルのDNA量が同じ (0.1  $\mu$ g) にな

るようベクタープラスミドで調整した。

また、トランスフェクションの際には、実施例2の(3)で得たレポータープラスミド(NF- $\kappa$ B結合配列とホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むp(kB)4-Luc)を同時に加えてトランスフェクションした。

- 5 トランスフェクションの24時間後、培地中にTNF- $\alpha$ を最終濃度20ng/mlとなるよう添加した(コントロールはTNF- $\alpha$ 無添加とした)。さらに、5時間培養後、実施例2の(3)と同様にして、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

- その結果を、第4図(B)に示した(図中、TAK1K63Wの無印、+、++は、各々Flag-TAK1K63W発現ベクターの添加量0 $\mu$ g、0.03 $\mu$ g及び0.1 $\mu$ gを各々表す)。第4図(B)に示した通り、TNF- $\alpha$ 刺激によって誘導されたルシフェラーゼ活性の増加(NF- $\kappa$ Bの活性化)は、トランスフェクトに用いた変異型TAK1発現ベクターの用量に依存して抑制された。

- 15 この結果から、キナーゼ活性を欠く変異型TAK1は、細胞内で発現させることにより、NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制することがわかった。

- このことは、前記(2)の結果と同様、NF- $\kappa$ B活性化経路においてTAK1が主要な働きをする分子であることを裏付けるとともに、TAK1のキナーゼ活性やTAK1の活性化を阻害する薬物が、NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制することを強く裏付けるものである。

#### 実施例6 細胞内におけるTAK1とTAB1の相互作用

- 以下のようにして、TAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞を用い、免疫沈降法により細胞内におけるTAK1とTAB1の相互作用(結合)を検出した。

##### (1) 細胞のトランスフェクション

- まず、実施例5と同様にして、フラッグ付加された野生型TAK1(Flag-TAK1)又は変異型TAK1(Flag-TAK1K63W)の発現ベクターを、単独もしくはTAB1発現ベクターとともに、HeLa細胞にトランスフェクションした。

##### (2) 免疫沈降および免疫ブロッティング

- トランスフェクションの24時間後、細胞を回収し、以下のようにして細胞溶解液(cell lysate)を調製した。すなわち、細胞を、細胞溶解緩衝液(25mM HEPES(pH7.7)、0.3M NaCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM EDTA、0.1% Triton X-100、20mM  $\beta$ -glycerophosphate、0.1mM sodium orthovanadate、0.5mM

PMSF、1mM DTT、10  $\mu$ g/ml aprotinin、10  $\mu$ g/ml leupeptine) を用いて溶解した後、3 倍に希釈し、10 分間氷冷した。遠心後、上清を分取し、これを細胞溶解液として以下の操作に用いた。

前記で得た細胞溶解液を、抗フラッグ抗体 (M5、コダック社製) とともに 1.5 時間氷冷インキュベートし、さらにプロテイン G セファロース (Pharmacia 社製) を添加し、4  $^{\circ}$ C、1.5 時間緩やかに混合して、免疫複合体をプロテイン G セファロースビーズに吸着させた。このビーズを遠心により回収した後、洗浄用緩衝液 (20mM HEPES(pH7.7)、50mM NaCl、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM EDTA、0.05% Triton X-100) で 5 回洗浄し、これを免疫沈降画分として以下の操作に用いた。

前記ビーズ (免疫沈降画分) を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜に転写し、免疫プロットティングを行って、免疫沈降画分中に存在する TAB1 及び TAK1 を検出した。TAK1 及び TAB1 を検出するための抗体としては、抗 TAK1 抗体 (M-17) (Santa Cruz Biotechnology 社製) 及び抗 TAB1 抗体 (N-19) (Santa Cruz Biotechnology 社製) を各々用いた。

抗フラッグ免疫沈降画分の免疫プロットティングの結果を第 5 図に示した。上段は、抗 TAB1 抗体での検出結果、また下段は抗 TAK1 抗体での検出結果である。

第 5 図に示した通り、野生型 TAK1 (Flag-TAK1) を発現増強させた細胞の抗フラッグ免疫沈降画分中に、TAB1 が共存していた。また、野生型にかえて変異型 TAK1 (Flag-TAK1 K63W) を発現増強させた細胞においても同様に、免疫沈降画分中に TAB1 が共存していた。

このように、TAB1 は TAK1 (野生型及び変異型) と共免疫沈降されたことから、TAK1 と TAB1 は細胞内で相互作用していることがわかる。

また、野生型 TAK1 と TAB1 は、共発現させた場合に両者とも SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動での移動度がやや減少する傾向が見られたが、キナーゼ活性を有しない変異型 TAK1 の場合にはこのような移動度の減少は見られなかった。このような移動度の減少は、両蛋白質が、機能的な相互作用によりリン酸化を受けたことを反映していると考えられた。

### (3) 被験物質の作用の検定

前記 (1) と同様にして、TAK1 を TAB1 とともに発現増強させた細胞を得、これを被験物質の存在下又は非存在下に培養する。培養後の細胞について、前記 (2) と同様にして免疫沈降法により TAK1 と TAB1 の相互作用 (結合) を検出する。被験物質の存在によって、TAK1 と TAB1 の共免疫沈降が

減少するかどうかを判定することにより、その被験物質のTAK1とTAB1の相互作用（結合）に対する被験物質の作用を検定する。

#### 実施例7 TAK1による自己リン酸化とTAB1リン酸化

- 5 以下のようにして、TAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞から免疫沈降させたTAK1について、キナーゼアッセイを実施し、TAK1による自己リン酸化とTAB1のリン酸化を検出した。

##### (1) 細胞のトランスフェクション及び免疫沈降

- 10 まず、実施例5と同様にして、フラッグ付加された野生型TAK1 (Flag-TAK1) 又は変異型TAK1 (Flag-TAK1 K63W) の発現ベクターを、単独もしくはTAB1発現ベクターとともに、HeLa細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後の細胞から、実施例6と同様にして細胞溶解液を調製し、抗フラッグ抗体による免疫沈降を行った。

##### (2) キナーゼアッセイ

- 15 前記で得た抗フラッグ免疫沈降画分を用い、以下のようにして、インビトロのキナーゼ反応を行った。

- すなわち、免疫沈降画分を、30  $\mu$ lのキナーゼ緩衝液 (20mM HEPES(pH 7.6)、20mM MgCl<sub>2</sub>、2mM DTT、20  $\mu$ M ATP、20mM  $\beta$ -glycerophosphate、20 mM disodium p-nitrophenylphosphate、0.1mM sodium orthovanadate、  
20 3  $\mu$  Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP) に加え、30℃、30分間インキュベートした。反応終了後、反応液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、泳動後のゲルについてオートラジオグラフィーを実施した。

- 25 その結果、第6図に示した通り、野生型TAK1 (Flag-TAK1) とTAB1の両者を発現増強させた細胞の抗フラッグ免疫沈降画分では、TAK1のリン酸化（自己リン酸化）及びTAB1のリン酸化が認められた。しかし、野生型TAK1のみを発現増強させた細胞の免疫沈降画分では、TAK1及びTAB1のいずれのリン酸化も認められなかった。また、キナーゼ活性を欠く変異型TAK1については、TAB1と共に発現増強させた場合でもリン酸化は認められなかった。

- 30 これらのことから、TAK1はTAB1と共存することにより活性化されて、TAK1の自己リン酸化及びTAK1によるTAB1のリン酸化が起こると考えられた。

#### 実施例8 細胞内におけるTAK1とIKKとの相互作用

- 35 以下のようにして、TAK1をIKKとともに発現増強させた細胞を用い、免

疫沈降法により細胞内におけるTAK1とIKKとの相互作用(結合)を検出した。

(1) 細胞のトランスフェクション

まず、ヒトIKK $\alpha$ およびヒトIKK $\beta$ の各cDNAを、ベクタープラスミド  
5 p cDNA 3.1 (+) His B (Invitrogen社製)に組込むことによりIKK  
の発現ベクターを取得した。ヒトIKK $\alpha$  (Genbank/EMBL accession No.AF  
012890; Cell, 第90巻、第373~383頁、1997年)、およびヒトIKK $\beta$  (Genb  
ank/EMBL accession No.AF029684; Science, 第278巻、第866~869頁、1997  
年)のcDNAは、ヒト単球由来細胞株(THP-1)のmRNAから逆転写P  
10 CR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)により取得したもの  
を用いた。

これらIKK発現ベクター(IKK $\alpha$ 発現ベクター及びIKK $\beta$ 発現ベク  
ター)により、Xpressタグポリペプチドが付加されたIKK(Xpress  
-IKK $\alpha$ またはXpress-IKK $\beta$ )を発現させることができる。

15 次に、実施例5と同様にして、フラッグ付加した野生型TAK1(Flag-  
TAK1)の発現ベクターを、単独又はTAB1発現ベクターとともにHeLa  
細胞にトランスフェクションした。この際、前記で得たIKK(Xpress-  
IKK $\alpha$ またはXpress-IKK $\beta$ )の発現ベクターも同時に添加(又は非  
添加)してトランスフェクションした。

20 (2) 免疫沈降及び免疫プロットティング

トランスフェクションの24時間後の細胞から、実施例6と同様にして、細胞  
溶解液を調製、抗フラッグ抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降画分及び細胞  
溶解液についてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った後、免疫プロット  
ティングを行って、IKK及びTAK1を検出した。

25 IKK(Xpress-IKK $\alpha$ 及び $\beta$ )及びTAK1を検出するための抗体  
としては、抗Xpress抗体(M-21) (Santa Cruz Biotechnology社製)  
及び抗-TAK1抗体(M-17) (Santa Cruz Biotechnology社製)を各々用  
いた。

抗フラッグ免疫沈降画分の免疫プロットティングの結果を第7図に示した。

30 上段は、抗フラッグ免疫沈降画分の抗Xpress抗体による検出結果、中段は、  
細胞溶解液の抗Xpress抗体による検出結果、また下段は、抗フラッグ免疫  
沈降画分の抗TAK1抗体による検出結果である。

第7図に示した通り、TAK1(Flag-TAK1)とIKK(Xpress-  
IKK $\alpha$ 又はXpress-IKK $\beta$ )を発現増強させTAB1は発現増強  
35 させなかった細胞では、抗フラッグ免疫沈降画分中にIKKが検出された。この

ようにIKK (IKK $\alpha$ 及び $\beta$ )がTAK1と共免疫沈降されたことから、TAK1とIKK (IKK $\alpha$ 及び $\beta$ )は細胞内で相互作用していることがわかった。

しかし、TAK1、IKKとともにTAB1も発現増強させた細胞では、抗フラッグ免疫沈降画分中にIKKは検出されなかった。このことから、TAK1は、  
5 活性化されていない状態では細胞内でIKKと安定な結合を生じるが、TAB1により活性化された状態では、細胞内でのIKKとの結合との安定な結合が見られないと考えられた。

また、細胞溶解液の免疫抽出液の免疫ブロッティングの結果、TAK1及びIKKとともにTAB1も発現増強させた細胞においては、IKK (IKK $\alpha$ 及び $\beta$ )のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動での移動度がやや減少する傾向が認められた。一方、このような傾向は、TAB1を発現増強させなかった細胞  
10 においては見られなかった。

これらのことから、TAB1で活性化されたTAK1の存在によって、IKKの両サブユニット (IKK $\alpha$ 及び $\beta$ )は細胞内でリン酸化を受けるものと考えられた。すなわち、TAK1は、NIK (Regnier et al.,1997; Woronicz et al.,  
15 1997)と同様に、IKK (又はIKK複合体と機能的に相互作用する分子)をリン酸化して、IKKのキナーゼ活性を促進することにより、NF- $\kappa$ B活性化を誘導すると考えられる。

## 20 実施例9 TAK1によるIKK複合体の活性化

以下のようにして、TAK1をTAB1とともに発現増強させた細胞から免疫沈降させたIKK複合体について、IKKを基質とするキナーゼ反応 (IKKキナーゼアッセイ)を実施し、IKK複合体の活性化を検出した。

### (1) 細胞のトランスフェクション及び免疫沈降

25 まず、実施例5と同様にして、フラッグ付加された野生型TAK1 (Flag-TAK1)又は変異型TAK1 (Flag-TAK1K63W)の発現ベクターを、単独もしくはTAB1発現ベクターとともに、HeLa細胞にトランスフェクションした。

また、外来性IKKを発現増強させる系では、実施例8と同様に、Xpressタグ付加されたIKK (Xpress-IKK $\alpha$ 又はXpress-IKK $\beta$ )の発現ベクターも同時に添加してトランスフェクションした。  
30

トランスフェクションの24時間後の細胞から、実施例6と同様にして、細胞溶解液を調製し、免疫沈降を行った。但、免疫沈降に用いる抗体は、内在性IKK複合体を免疫沈降させるためには抗IKK $\alpha$ 抗体 (H-744) (Santa Cruz Bio-  
35 technology社製)を用い、また外来性IKKの免疫沈降のためには抗Xpress



s 抗体 (M-21) (Santa Cruz Biotechnology 社製) を用いた。用いた抗 I K K  $\alpha$  抗体は、I K K  $\alpha$  と同様 I K K  $\beta$  も認識する。

## (2) I K K キナーゼアッセイ

前記で得られた免疫沈降画分について、実施例 7 と同様にして、インビトロの  
5 キナーゼ反応を行った。但、基質として、組換え I  $\kappa$  B (2.5  $\mu$ g) を反応系に添加した。反応終了後、反応液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、泳動後のゲルについてオートラジオグラフィーを実施した。

反応基質とする組換え I  $\kappa$  B としては、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) の C 末端にヒト I  $\kappa$  B  $\alpha$  の第 1 から 54 番目までのアミノ酸残基からなる部分ポリペプチドを連結した融合ペプチド (以下、GST-I  $\kappa$  B  $\alpha$  1-54) を用いた。  
10

組換え I  $\kappa$  B は、大腸菌宿主に GST-I  $\kappa$  B  $\alpha$  1-54 の発現ベクターを導入した形質転換株の培養物から調製した。GST-I  $\kappa$  B  $\alpha$  1-54 の発現ベクターは、ヒト I  $\kappa$  B  $\alpha$  (Genbank/EMBL accession No.M69043; Cell、第 65 巻、第 1281  
15 ~1289 頁、1991 年) の cDNA のうち第 1 から 54 番目までのアミノ酸残基をコードする cDNA 部分を、ベクタープラスミド pGEX-2T (Pharmacia 社製) の BamHI-EcoRI 切断部位に挿入して作製した。

I K K キナーゼアッセイの結果を第 8 図に示した。(A) は、内在性 I K K 複合体 (抗 I K K  $\alpha$  抗体による免疫沈降画分) のキナーゼアッセイの結果であり、  
20 (B) は、外来性 I K K (抗 Xpress 抗体による免疫沈降画分) のキナーゼアッセイの結果である。

第 8 図 (A) に示した通り、フラッグ付加した野生型 TAK1 (Flag-TAK1) および TAB1 を共に発現増強させた場合、内在性 I K K 複合体の I K K キナーゼ活性は顕著に増加した。一方、キナーゼ活性を欠く変異型 TAK1 (Flag-TAK1 K63W) は I K K 活性を促進しなかった。  
25

また、外来性 I K K を発現させた細胞においても、第 8 図 (B) に示した通り、野生型 TAK1 を TAB1 と共に発現増強させた場合、外来性 I K K  $\alpha$  及び  $\beta$  の I K K キナーゼ活性が増大したが、変異型 TAK1 では TAB1 と共に発現増強させても I K K キナーゼ活性は増大しなかった。

30 これらの結果は、TAB1 により活性化された TAK1 は、I K K  $\alpha$  及び I K K  $\beta$  を活性化することにより NF- $\kappa$ B を活性化することを裏付ける。

## (3) 被験物質の作用の検定

前記と同様の系を用い、TAK1 による I K K 複合体活性化に対する被験物質の作用を検定することができる。すなわち、TAK1 を TAB1 とともに発現増強した細胞を得、これを被験物質の存在下又は非存在下に培養する。培養後の細  
35

胞について、前記と同様にして I K K 複合体画分を免疫沈降させ、免疫沈降画分の I K K キナーゼ活性を測定して、被験物質の存在により I K K キナーゼ活性が減少するかどうかを判定する。

5 産業上の利用可能性

本発明の方法は、新しい伝達分子に焦点をあてた NF- $\kappa$ B 活性化抑制薬の同定方法およびスクリーニング方法となる。本発明によれば、TAK1 に作用点を有する、新しいタイプの NF- $\kappa$ B 活性化抑制薬を得ることができる。また、本発明の方法は、自己免疫疾患、炎症症状を呈する難治性疾患などの疾患の治療薬及び／又は予防薬の同定方法及びスクリーニング方法としても有用である。

本発明の方法により選択された薬物、あるいは同定された薬物は、作用点が明らかとなっているので、医薬品としての開発に有利である。

また、TAK1 の機能を阻害又は抑制する作用を有する薬物は、新しいタイプの NF- $\kappa$ B 活性化抑制薬となるほか、自己免疫疾患（慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、ベーチェット病、結節性動脈周囲炎、潰瘍性大腸炎、糸球体腎炎など）、炎症症状を呈する難治性疾患（変形性関節症、アテローム硬化症、乾癬、アトピー性皮膚炎など）、各種ウイルス性疾患、エンドトキシンショック、敗血症などの疾患の治療薬及び／又は予防薬となる。

## 請求の範囲

1. TGF- $\beta$ アクチベーターキナーゼ1 (TAK1) の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、ニュークレオファクターカッパB (NF- $\kappa$ B) 活性化抑制薬の同定方法又はスクリーニング方法。  
5
2. 被験物質の変調作用が、TAK1の機能を阻害又は抑制する作用である請求の範囲第1項記載の方法。
3. TAK1の機能が、
  - (1) TAK1とTAK1結合蛋白質1との相互作用、
  - 10 (2) TAK1のプロテインキナーゼ活性、
  - (3) 細胞内のTAK1によるI $\kappa$ Bキナーゼ (IKK) 複合体の活性化、及び
  - (4) 細胞内のTAK1により誘導されるNF- $\kappa$ B活性化から選択されるものである、請求の範囲第2項記載の方法。
4. TAK1の機能が、TAK1のプロテインキナーゼ活性である請求の範囲  
15 第2項記載の方法。
5. TAK1の機能が、細胞内のTAK1によるIKK複合体の活性化である請求の範囲第2項記載の方法。
6. TAK1とTAK1結合蛋白質1とを発現増強させた試験用細胞を用い、試験用細胞を被験物質と共存させる工程を含む請求の範囲第1項記載の方法。
- 20 7. NF- $\kappa$ B活性化抑制薬が同時に自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬である、請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項記載の方法。
8. 請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項記載の方法により、選択又は同定された、NF- $\kappa$ B活性化抑制薬。
- 25 9. TAK1の機能を変調させる薬物を主成分とするNF- $\kappa$ B活性化抑制薬。
10. NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機能に対する被験物質の変調作用を検定する工程を含む、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬の同定方法又はスクリーニング方法。
11. 請求の範囲第10項記載の方法により、選択又は同定された自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬。  
30
12. NF- $\kappa$ B活性化経路におけるTAK1の機能を阻害又は抑制する作用を有する薬物を主成分とする、自己免疫疾患又は炎症症状を呈する難治性疾患の治療薬及び／又は予防薬。

1 / 7

## 第 1 図

```

mTAK1 : MSTASAASSSSSSSEMIEAPSQVLNFEEDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV 60
hTAK1a : MSTASAASSSSSSSAGEMIEAPSQVLNFEEDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV 60
hTAK1b : MSTASAASSSSSSSAGEMIEAPSQVLNFEEDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV 60
hTAK1c : MSTASAASSSSSSSAGEMIEAPSQVLNFEEDYKEIEVEEVVGRGAFGVVCKAKWRAKDV 60

mTAK1 : AIKQIESESERKAFIVELRQLSRVNHFNIVKLYGACLNFPVCLVMEYAEGGSLYNVLHGAE 120
hTAK1a : AIKQIESESERKAFIVELRQLSRVNHFNIVKLYGACLNFPVCLVMEYAEGGSLYNVLHGAE 120
hTAK1b : AIKQIESESERKAFIVELRQLSRVNHFNIVKLYGACLNFPVCLVMEYAEGGSLYNVLHGAE 120
hTAK1c : AIKQIESESERKAFIVELRQLSRVNHFNIVKLYGACLNFPVCLVMEYAEGGSLYNVLHGAE 120

mTAK1 : PLPYTTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKALIHRLDKPPNLLLVAGGTVLKICDFGTAC 180
hTAK1a : PLPYTTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKALIHRLDKPPNLLLVAGGTVLKICDFGTAC 180
hTAK1b : PLPYTTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKALIHRLDKPPNLLLVAGGTVLKICDFGTAC 180
hTAK1c : PLPYTTAAHAMSWCLQCSQGVAYLHSMQPKALIHRLDKPPNLLLVAGGTVLKICDFGTAC 180

mTAK1 : DIQTHMTNNKGSAAWMAPEVFEQSNYSEKCDVFSWGIILWEVITRRKPFDEIGGPAFRIM 240
hTAK1a : DIQTHMTNNKGSAAWMAPEVFEQSNYSEKCDVFSWGIILWEVITRRKPFDEIGGPAFRIM 240
hTAK1b : DIQTHMTNNKGSAAWMAPEVFEQSNYSEKCDVFSWGIILWEVITRRKPFDEIGGPAFRIM 240
hTAK1c : DIQTHMTNNKGSAAWMAPEVFEQSNYSEKCDVFSWGIILWEVITRRKPFDEIGGPAFRIM 240

mTAK1 : WAVHNGTRPPLIKNLPKPIESLMTRCWSKDFSORPSMEEIVKIMTHLMRYFPGADEPLQY 300
hTAK1a : WAVHNGTRPPLIKNLPKPIESLMTRCWSKDFSORPSMEEIVKIMTHLMRYFPGADEPLQY 300
hTAK1b : WAVHNGTRPPLIKNLPKPIESLMTRCWSKDFSORPSMEEIVKIMTHLMRYFPGADEPLQY 300
hTAK1c : WAVHNGTRPPLIKNLPKPIESLMTRCWSKDFSORPSMEEIVKIMTHLMRYFPGADEPLQY 300

mTAK1 : PCQYSDGQNSATSTGSMFMDIASNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLESKLLKNQAKQQ 360
hTAK1a : PCQYSDGQNSATSTGSMFMDIASNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLESKLLKNQAKQQ 360
hTAK1b : PCQYSDGQNSATSTGSMFMDIASNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLESKLLKNQAKQQ 360
hTAK1c : PCQYSDGQNSATSTGSMFMDIASNTSNKSDTNMEQVPATNDTIKRLESKLLKNQAKQQ 360

mTAK1 : SESGRSLGASRGSSVESLPPTSEGKMSADMSEIEARIAATA----- 403
hTAK1a : SESGRSLGASRGSSVESLPPTSEGKMSADMSEIEARIAATT----- 403
hTAK1b : SESGRSLGASRGSSVESLPPTSEGKMSADMSEIEARIAATTAYSKPKRGHKTASFGN 420
hTAK1c : SESGRSLGASRGSSVESLPPTSEGKMSADMSEIEARIAATTAYSKPKRGHKTASFGN 420

mTAK1 : -----GNGQPRRRSIQDLTVGTGTEPGQVSSRSSSPSVRMITTSOPTSEKPTRSHP 453
hTAK1a : -----GNGQPRRRSIQDLTVGTGTEPGQVSSRSSSPSVRMITTSOPTSEKPTRSHP 453
hTAK1b : ILDVPEIVISGNGQPRRRSIQDLTVGTGTEPGQVSSRSSSPSVRMITTSOPTSEKPTRSHP 480
hTAK1c : ILDVPEIVISGNGQPRRRSIQDLTVGTGTEPGQVSSRSSSPSVRMITTSOPTSEKPTRSHP 480

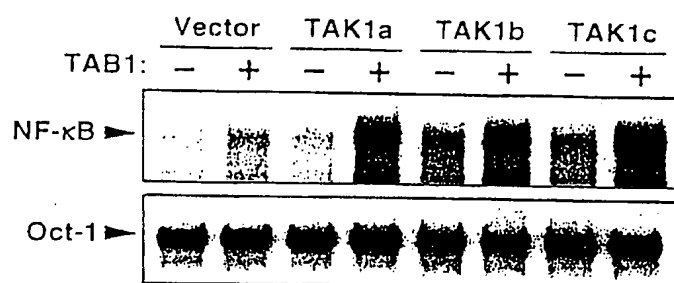
mTAK1 : WTPDDSTDTNGSDNSIPMAYLTLDHQLQPLAPCPNSKESMAVFEQHCKMAQEYMKVQTEI 513
hTAK1a : WTPDDSTDTNGSDNSIPMAYLTLDHQLQPLAPCPNSKESMAVFEQHCKMAQEYMKVQTEI 513
hTAK1b : WTPDDSTDTNGSDNSIPMAYLTLDHQLQPLAPCPNSKESMAVFEQHCKMAQEYMKVQTEI 540
hTAK1c : WTPDDSTDTNGSDNSIPMAYLTLDHQLQ----- 508

mTAK1 : ALLLQKQELVAELDQDEKQDQNTSRLVQEHKLLDENKSLSTYYQCKKQLEVIRSQQQ 573
hTAK1a : ALLLQKQELVAELDQDEKQDQNTSRLVQEHKLLDENKSLSTYYQCKKQLEVIRSQQQ 573
hTAK1b : ALLLQKQELVAELDQDEKQDQNTSRLVQEHKLLDENKSLSTYYQCKKQLEVIRSQQQ 600
hTAK1c : -----QELVAELDQDEKQDQNTSRLVQEHKLLDENKSLSTYYQCKKQLEVIRSQQQ 561

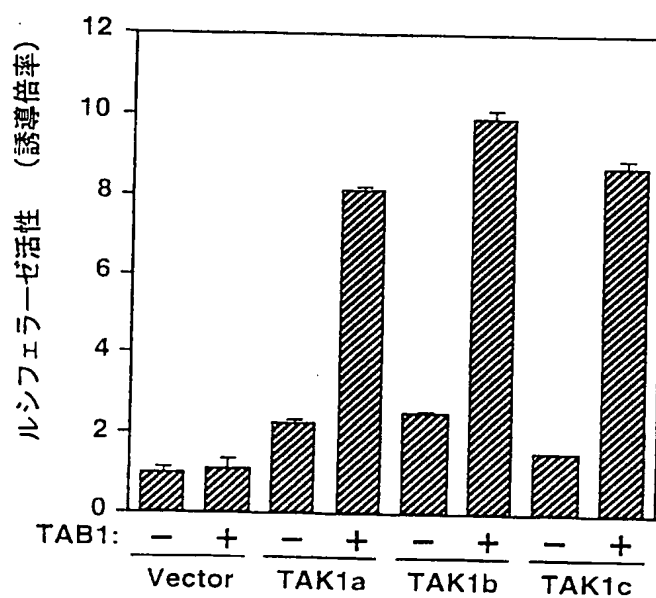
mTAK1 : KRQGTS 579
hTAK1a : KRQGTS 579
hTAK1b : KRQGTS 606
hTAK1c : KRQGTS 567

```

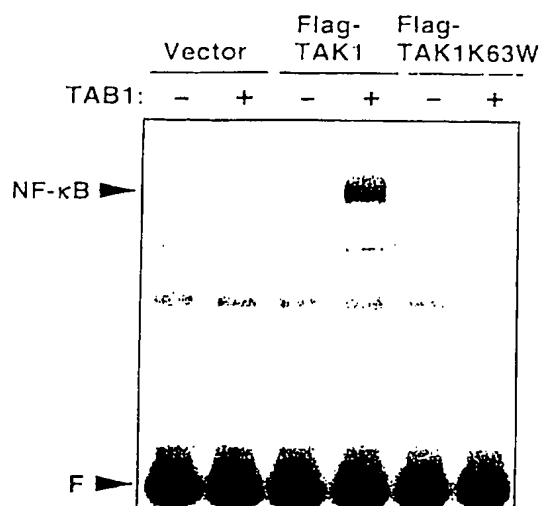
## 第2図



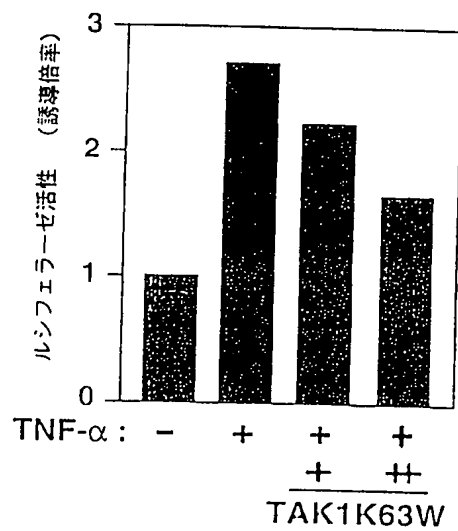
## 第3図



## 第4図 (A)

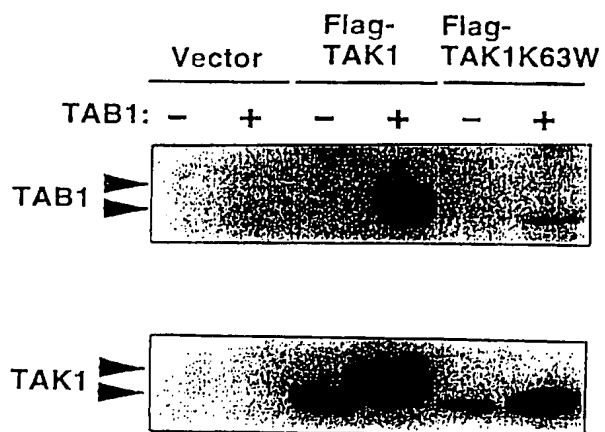


## 第4図 (B)

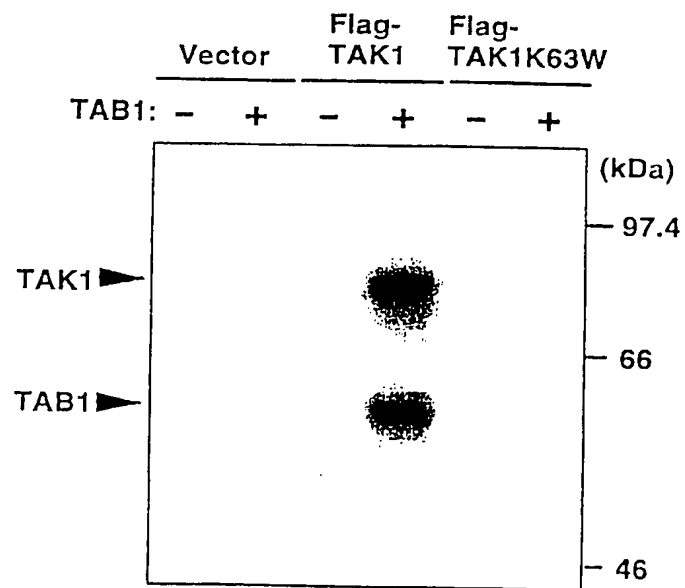


4/7

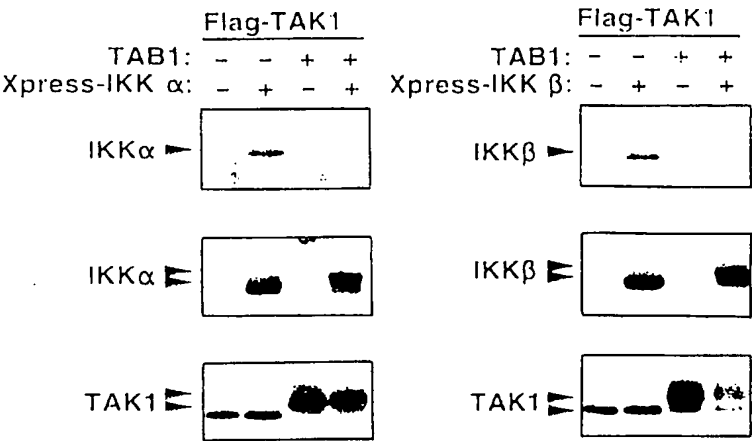
## 第5図



## 第6図

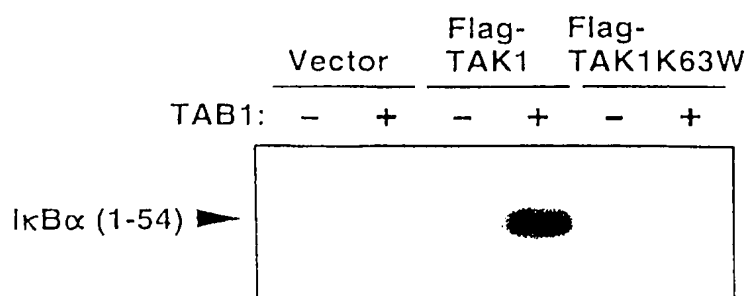


第 7 図

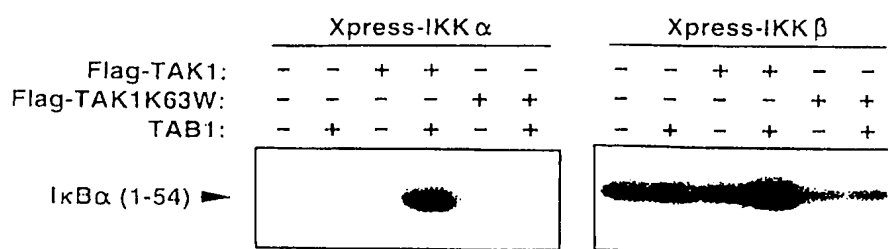




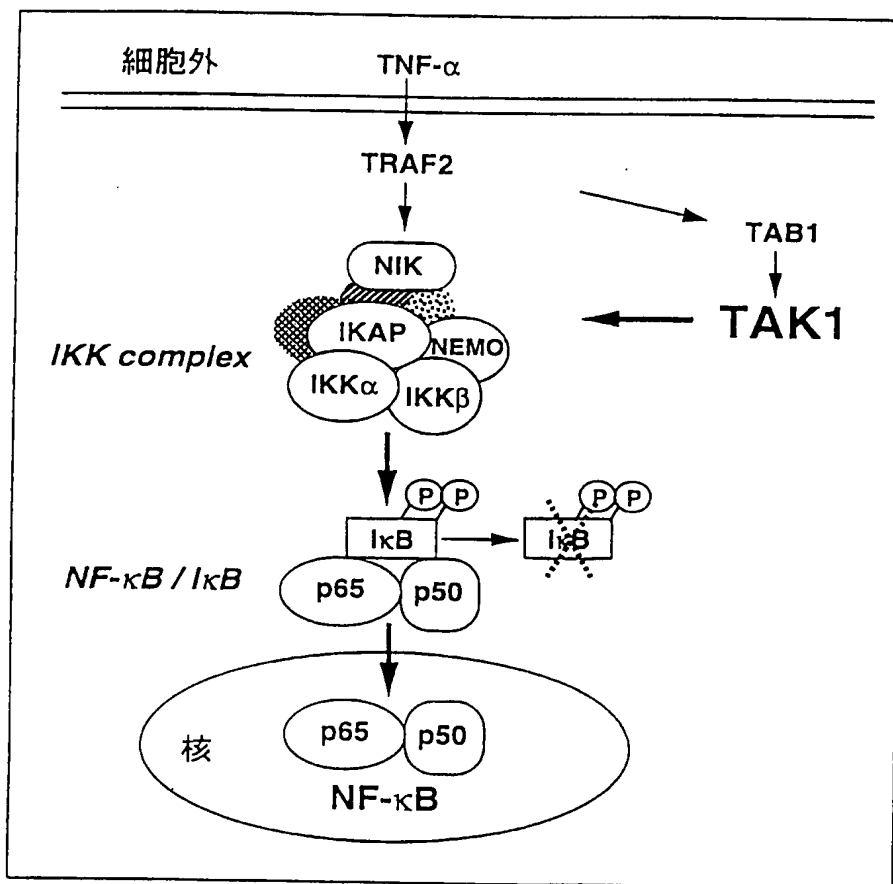
## 第 8 図 (A)



## 第 8 図 (B)



## 第9図



## SEQUENCE LISTING

<110> TANABE SEIYAKU CO., LTD.

<110> SUGITA Takahisa

<110> SAKURAI Hiroaki

<110> KAGEYAMA Noriko

<110> HASEGAWA Ko

<120> NF- $\kappa$ B activation depressant targeting TAK1 and identifying method thereof

<130> FP2293PCT

<150> JP26003/1998

<151> 6-FEB-1998

<150> JP309316/1998

<151> 30-OCT-1998

<160> 7

<170> Microsoft Word 97

<210> 1

<211> 30

<212> nucleic acid

<213> other nucleic acid (Synthesized primer)

<400> 1

GGCCAGATCT ATGTCGACAG CCTCCGCCGC

30

<210> 2

<211> 30

<212> nucleic acid

<213> other nucleic acid (Synthesized primer)

<400> 2

GCGCAGATCT TCATGAAGTG CCTTGTCGTT

30

<210> 3

<211> 2785

<212> nucleic acid

## &lt;213&gt; cDNA to mRNA

&lt;400&gt; 3

GGACACGGCT GTGGCCGCTG CCTCTACCCC CGCCACGGAT CGCCGGGTAG TAGGACTGCG	60
CGGCTCCAGG CTGAGGGTCG GTCCGGAGGC GGGTGGGCGC GGGTCTCACC CGGATTGTCC	120
GGGTGGCACC GTTCCCGGCC CCACCGGGCG CCGCGAGGGA TC	162
ATG TCT ACA GCC TCT GCC GCC TCC TCC TCC TCC TCG TCT TCG GCC	207
Met Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala	
1 5 10 15	
GGT GAG ATG ATC GAA GCC CCT TCC CAG GTC CTC AAC TTT GAA GAG	252
Gly Glu Met Ile Glu Ala Pro Ser Gln Val Leu Asn Phe Glu Glu	
20 25 30	
ATC GAC TAC AAG GAG ATC GAG GTG GAA GAG GTT GTT GGA AGA GGA	297
Ile Asp Tyr Lys Glu Ile Glu Val Glu Glu Val Val Gly Arg Gly	
35 40 45	
GCC TTT GGA GTT GTT TGC AAA GCT AAG TGG AGA GCA AAA GAT GTT	342
Ala Phe Gly Val Val Cys Lys Ala Lys Trp Arg Ala Lys Asp Val	
50 55 60	
GCT ATT AAA CAA ATA GAA AGT GAA TCT GAG AGG AAA GCG TTT ATT	387
Ala Ile Lys Gln Ile Glu Ser Glu Ser Glu Arg Lys Ala Phe Ile	
65 70 75	
GTA GAG CTT CGG CAG TTA TCC CGT GTG AAC CAT CCT AAT ATT GTA	432
Val Glu Leu Arg Gln Leu Ser Arg Val Asn His Pro Asn Ile Val	
80 85 90	
AAG CTT TAT GGA GCC TGC TTG AAT CCA GTG TGT CTT GTG ATG GAA	477
Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Leu Asn Pro Val Cys Leu Val Met Glu	
95 100 105	
TAT GCT GAA GGG GGC TCT TTA TAT AAT GTG CTG CAT GGT GCT GAA	522
Tyr Ala Glu Gly Gly Ser Leu Tyr Asn Val Leu His Gly Ala Glu	
110 115 120	
CCA TTG CCA TAT TAT ACT GCT GCC CAC GCA ATG AGT TGG TGT TTA	567
Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu	
125 130 135	
CAG TGT TCC CAA GGA GTG GCT TAT CTT CAC AGC ATG CAA CCC AAA	612
Gln Cys Ser Gln Gly Val Ala Tyr Leu His Ser Met Gln Pro Lys	

3/14

140	145	150	
GCG CTA ATT CAC AGG GAC CTG AAA CCA CCA AAC TTA CTG CTG GTT			657
Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Pro Asn Leu Leu Leu Val			
155	160	165	
GCA GGG GGG ACA GTT CTA AAA ATT TGT GAT TTT GGT ACA GCC TGT			702
Ala Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Thr Ala Cys			
170	175	180	
GAC ATT CAG ACA CAC ATG ACC AAT AAC AAG GGG AGT GCT GCT TGG			747
Asp Ile Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly Ser Ala Ala Trp			
185	190	195	
ATG GCA CCT GAA GTT TTT GAA GGT AGT AAT TAC AGT GAA AAA TGT			792
Met Ala Pro Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Lys Cys			
200	205	210	
GAC GTC TTC AGC TGG GGT ATT ATT CTT TGG GAA GTG ATA ACG CGT			837
Asp Val Phe Ser Trp Gly Ile Ile Leu Trp Glu Val Ile Thr Arg			
215	220	225	
CGG AAA CCC TTT GAT GAG ATT GGT GGC CCA GCT TTC CGA ATC ATG			882
Arg Lys Pro Phe Asp Glu Ile Gly Gly Pro Ala Phe Arg Ile Met			
230	235	240	
TGG GCT GTT CAT AAT GGT ACT CGA CCA CCA CTG ATA AAA AAT TTA			927
Trp Ala Val His Asn Gly Thr Arg Pro Pro Leu Ile Lys Asn Leu			
245	250	255	
CCT AAG CCC ATT GAG AGC CTG ATG ACT CGT TGT TGG TCT AAA GAT			972
Pro Lys Pro Ile Glu Ser Leu Met Thr Arg Cys Trp Ser Lys Asp			
260	265	270	
CCT TCC CAG CGC CCT TCA ATG GAG GAA ATT GTG AAA ATA ATG ACT			1017
Pro Ser Gln Arg Pro Ser Met Glu Glu Ile Val Lys Ile Met Thr			
275	280	285	
CAC TTG ATG CGG TAC TTT CCA GGA GCA GAT GAG CCA TTA CAG TAT			1062
His Leu Met Arg Tyr Phe Pro Gly Ala Asp Glu Pro Leu Gln Tyr			
290	295	300	
CCT TGT CAG TAT TCA GAT GAA GGA CAG AGC AAC TCT GCC ACC AGT			1107
Pro Cys Gln Tyr Ser Asp Glu Gly Gln Ser Asn Ser Ala Thr Ser			
305	310	315	

4/14

ACA GGC TCA TTC ATG GAC ATT GCT TCT ACA AAT ACG AGT AAC AAA	1152
Thr Gly Ser Phe Met Asp Ile Ala Ser Thr Asn Thr Ser Asn Lys	
320 325 330	
AGT GAC ACT AAT ATG GAG CAA GTT CCT GCC ACA AAT GAT ACT ATT	1197
Ser Asp Thr Asn Met Glu Gln Val Pro Ala Thr Asn Asp Thr Ile	
335 340 345	
AAG CGC TTA GAA TCA AAA TTG TTG AAA AAT CAG GCA AAG CAA CAG	1242
Lys Arg Leu Glu Ser Lys Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Gln Gln	
350 355 360	
AGT GAA TCT GGA CGT TTA AGC TTG GGA GCC TCC CGT GGG AGC AGT	1287
Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser Leu Gly Ala Ser Arg Gly Ser Ser	
365 370 375	
GTG GAG AGC TTG CCC CCA ACC TCT GAG GGC AAG AGG ATG AGT GCT	1332
Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser Glu Gly Lys Arg Met Ser Ala	
380 385 390	
GAC ATG TCT GAA ATA GAA GCT AGG ATC GCC GCA ACC ACA GGC AAC	1377
Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile Ala Ala Thr Thr Gly Asn	
395 400 405	
GGA CAG CCA AGA CGT AGA TCC ATC CAA GAC TTG ACT GTA ACT GGA	1422
Gly Gln Pro Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp Leu Thr Val Thr Gly	
410 415 420	
ACA GAA CCT GGT CAG GTG AGC AGT AGG TCA TCC AGT CCC AGT GTC	1467
Thr Glu Pro Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Ser Val	
425 430 435	
AGA ATG ATT ACT ACC TCA GGA CCA ACC TCA GAA AAG CCA ACT CGA	1512
Arg Met Ile Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys Pro Thr Arg	
440 445 450	
AGT CAT CCA TGG ACC CCT GAT GAT TCC ACA GAT ACC AAT GGA TCA	1557
Ser His Pro Trp Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn Gly Ser	
455 460 465	
GAT AAC TCC ATC CCA ATG GCT TAT CTT ACA CTG GAT CAC CAA CTA	1602
Asp Asn Ser Ile Pro Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln Leu	
470 475 480	

5/14

CAG CCT CTA GCA CCG TGC CCA AAC TCC AAA GAA TCT ATG GCA GTG	1647
Gln Pro Leu Ala Pro Cys Pro Asn Ser Lys Glu Ser Met Ala Val	
485 490 495	
TTT GAA CAG CAT TGT AAA ATG GCA CAA GAA TAT ATG AAA GTT CAA	1692
Phe Glu Gln His Cys Lys Met Ala Gln Glu Tyr Met Lys Val Gln	
500 505 510	
ACA GAA ATT GCA TTG TTA TTA CAG AGA AAG CAA GAA CTA GTT GCA	1737
Thr Glu Ile Ala Leu Leu Leu Gln Arg Lys Gln Glu Leu Val Ala	
515 520 525	
GAA CTG GAC CAG GAT GAA AAG GAC CAG CAA AAT ACA TCT CGC CTG	1782
Glu Leu Asp Gln Asp Glu Lys Asp Gln Gln Asn Thr Ser Arg Leu	
530 535 540	
GTA CAG GAA CAT AAA AAG CTT TTA GAT GAA AAC AAA AGC CTT TCT	1827
Val Gln Glu His Lys Lys Leu Leu Asp Glu Asn Lys Ser Leu Ser	
545 550 555	
ACT TAC TAC CAG CAA TGC AAA AAA CAA CTA GAG GTC ATC AGA AGT	1872
Thr Tyr Tyr Gln Gln Cys Lys Lys Gln Leu Glu Val Ile Arg Ser	
560 565 570	
CAG CAG CAG AAA CGA CAA GGC ACT TCA	1899
Gln Gln Gln Lys Arg Gln Gly Thr Ser	
575 579	
TGATTCTCTG GGACCGTTAC ATTTTGAAAT ATGCAAAGAA AGACTTTTTT TTTAAGGAAA	1959
GGAAAACCTT ATAATGACGA TTCATGAGTG TTAGCTTTTT GCGTGTTCT GAATGCCAAC	2019
TGCCTATATT TGCTGCATTT TTTTCATTGT TTATTTTCCT TTTCTCATGG TGGACATACA	2079
ATTTTACTGT TTCATTGCAT AACATGGTAG CATCTGTGAC TTGAATGAGC AGCACTTTGC	2139
AACTTCAAAA CAGATGCAGT GAACTGTGGC TGTATATGCA TGCTCATTGT GTGAAGGCTA	2199
GCCTAACAGA ACAGGAGGTA TCAAAC TAGC TGCTATGTGC AAACAGCGTC CATTTTTTCA	2259
TATTAGAGGT GGAACCTCAA GAATGACTTT ATTCTTGAT CTCATCTCAA AATATTAATA	2319
ATTTTTTTCC CAAAAGATGG TATATACCAA GTTAAAGACA GGGTATTATA AATTTAGAGT	2379
GATTGGTGGT ATATTACGGA AATACGGAAC CTTTAGGGAT AGTTCCGTGT AAGGGCTTTG	2439
ATGCCAGCAT CCTTGGATCA GTACTGAACT CAGTTCCATC CGTAAAATAT GTAAAGGTAA	2499
GTGGCAGCTG CTCTATTTAA TGAAAGCAGT TTTACCGGAT TTTGTTAGAC TAAAATTTGA	2559
TTGTGATACA TTGAACAAAA TGGAATCAT TTTTTTTTAA GGAGTAAAGA TTTTAAATTC	2619
TGTGATTGTG TGTATGTGTG TTGAACTGT AAAGCTTTTA TGA CTCTAAT ATTAATCTCT	2679
TAAATGAAAT TAAAAGGCAA AAGAACATGA TTGAGCTTAA ATGATCATTT CTTCCTGCAG	2739

6/14

TGATTCTTGG ATTGTTTTCT CATGTATTG AAAAAAAAAA AAAAAA

2785

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 2866

&lt;212&gt; nucleic acid

&lt;213&gt; cDNA to mRNA

&lt;400&gt; 4

GGACACGGCT GTGGCCGCTG CCTCTACCCC CGCCACGGAT CGCCGGGTAG TAGGACTGCG	60
CGGCTCCAGG CTGAGGGTCG GTCCGAGGC GGGTGGGCGC GGGTCTCACC CGGATTGTCC	120
GGGTGGCACC GTTCCCGGCC CCACGGGCG CCGCGAGGGA TC	162
ATG TCT ACA GCC TCT GCC GCC TCC TCC TCC TCC TCG TCT TCG GCC	207
Met Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala	
1 5 10 15	
GGT GAG ATG ATC GAA GCC CCT TCC CAG GTC CTC AAC TTT GAA GAG	252
Gly Glu Met Ile Glu Ala Pro Ser Gln Val Leu Asn Phe Glu Glu	
20 25 30	
ATC GAC TAC AAG GAG ATC GAG GTG GAA GAG GTT GTT GGA AGA GGA	297
Ile Asp Tyr Lys Glu Ile Glu Val Glu Glu Val Val Gly Arg Gly	
35 40 45	
GCC TTT GGA GTT GTT TGC AAA GCT AAG TGG AGA GCA AAA GAT GTT	342
Ala Phe Gly Val Val Cys Lys Ala Lys Trp Arg Ala Lys Asp Val	
50 55 60	
GCT ATT AAA CAA ATA GAA AGT GAA TCT GAG AGG AAA GCG TTT ATT	387
Ala Ile Lys Gln Ile Glu Ser Glu Ser Glu Arg Lys Ala Phe Ile	
65 70 75	
GTA GAG CTT CGG CAG TTA TCC CGT GTG AAC CAT CCT AAT ATT GTA	432
Val Glu Leu Arg Gln Leu Ser Arg Val Asn His Pro Asn Ile Val	
80 85 90	
AAG CTT TAT GGA GCC TGC TTG AAT CCA GTG TGT CTT GTG ATG GAA	477
Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Leu Asn Pro Val Cys Leu Val Met Glu	
95 100 105	
TAT GCT GAA GGG GGC TCT TTA TAT AAT GTG CTG CAT GGT GCT GAA	522
Tyr Ala Glu Gly Gly Ser Leu Tyr Asn Val Leu His Gly Ala Glu	
110 115 120	



7/14

CCA TTG CCA TAT TAT ACT GCT GCC CAC GCA ATG AGT TGG TGT TTA	567
Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu	
125 130 135	
CAG TGT TCC CAA GGA GTG GCT TAT CTT CAC AGC ATG CAA CCC AAA	612
Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu	
140 145 150	
GCG CTA ATT CAC AGG GAC CTG AAA CCA CCA AAC TTA CTG CTG GTT	657
Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Pro Asn Leu Leu Leu Val	
155 160 165	
GCA GGG GGG ACA GTT CTA AAA ATT TGT GAT TTT GGT ACA GCC TGT	702
Ala Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Thr Ala Cys	
170 175 180	
GAC ATT CAG ACA CAC ATG ACC AAT AAC AAG GGG AGT GCT GCT TGG	747
Asp Ile Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly Ser Ala Ala Trp	
185 190 195	
ATG GCA CCT GAA GTT TTT GAA GGT AGT AAT TAC AGT GAA AAA TGT	792
Met Ala Pro Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Lys Cys	
200 205 210	
GAC GTC TTC AGC TGG GGT ATT ATT CTT TGG GAA GTG ATA ACG CGT	837
Asp Val Phe Ser Trp Gly Ile Ile Leu Trp Glu Val Ile Thr Arg	
215 220 225	
CGG AAA CCC TTT GAT GAG ATT GGT GGC CCA GCT TTC CGA ATC ATG	882
Arg Lys Pro Phe Asp Glu Ile Gly Gly Pro Ala Phe Arg Ile Met	
230 235 240	
TGG GCT GTT CAT AAT GGT ACT CGA CCA CCA CTG ATA AAA AAT TTA	927
Trp Ala Val His Asn Gly Thr Arg Pro Pro Leu Ile Lys Asn Leu	
245 250 255	
CCT AAG CCC ATT GAG AGC CTG ATG ACT CGT TGT TGG TCT AAA GAT	972
Pro Lys Pro Ile Glu Ser Leu Met Thr Arg Cys Trp Ser Lys Asp	
260 265 270	
CCT TCC CAG CGC CCT TCA ATG GAG GAA ATT GTG AAA ATA ATG ACT	1017
Pro Ser Gln Arg Pro Ser Met Glu Glu Ile Val Lys Ile Met Thr	
275 280 285	

8/14

CAC TTG ATG CGG TAC TTT CCA GGA GCA GAT GAG CCA TTA CAG TAT	1062
His Leu Met Arg Tyr Phe Pro Gly Ala Asp Glu Pro Leu Gln Tyr	
290 295 300	
CCT TGT CAG TAT TCA GAT GAA GGA CAG AGC AAC TCT GCC ACC AGT	1107
Pro Cys Gln Tyr Ser Asp Glu Gly Gln Ser Asn Ser Ala Thr Ser	
305 310 315	
ACA GGC TCA TTC ATG GAC ATT GCT TCT ACA AAT ACG AGT AAC AAA	1152
Thr Gly Ser Phe Met Asp Ile Ala Ser Thr Asn Thr Ser Asn Lys	
320 325 330	
AGT GAC ACT AAT ATG GAG CAA GTT CCT GCC ACA AAT GAT ACT ATT	1197
Ser Asp Thr Asn Met Glu Gln Val Pro Ala Thr Asn Asp Thr Ile	
335 340 345	
AAG CGC TTA GAA TCA AAA TTG TTG AAA AAT CAG GCA AAG CAA CAG	1242
Lys Arg Leu Glu Ser Lys Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Gln Gln	
350 355 360	
AGT GAA TCT GGA CGT TTA AGC TTG GGA GCC TCC CGT GGG AGC AGT	1287
Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser Leu Gly Ala Ser Arg Gly Ser Ser	
365 370 375	
GTG GAG AGC TTG CCC CCA ACC TCT GAG GGC AAG AGG ATG AGT GCT	1332
Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser Glu Gly Lys Arg Met Ser Ala	
380 385 390	
GAC ATG TCT GAA ATA GAA GCT AGG ATC GCC GCA ACC ACA GCC TAT	1377
Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile Ala Ala Thr Thr Ala Tyr	
395 400 405	
TCC AAG CCT AAA CGG GGC CAC CGT AAA ACT GCT TCA TTT GGC AAC	1422
Ser Lys Pro Lys Arg Gly His Arg Lys Thr Ala Ser Phe Gly Asn	
410 415 420	
ATT CTG GAT GTC CCT GAG ATC GTC ATA TCA GGC AAC GGA CAG CCA	1467
Ile Leu Asp Val Pro Glu Ile Val Ile Ser Gly Asn Gly Gln Pro	
425 430 435	
AGA CGT AGA TCC ATC CAA GAC TTG ACT GTA ACT GGA ACA GAA CCT	1512
Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp Leu Thr Val Thr Gly Thr Glu Pro	
440 445 450	

9/14

GGT CAG GTG AGC AGT AGG TCA TCC AGT CCC AGT GTC AGA ATG ATT	1557
Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Ser Val Arg Met Ile	
455 460 465	
ACT ACC TCA GGA CCA ACC TCA GAA AAG CCA ACT CGA AGT CAT CCA	1602
Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys Pro Thr Arg Ser His Pro	
470 475 480	
TGG ACC CCT GAT GAT TCC ACA GAT ACC AAT GGA TCA GAT AAC TCC	1647
Trp Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn Gly Ser Asp Asn Ser	
485 490 495	
ATC CCA ATG GCT TAT CTT ACA CTG GAT CAC CAA CTA CAG CCT CTA	1692
Ile Pro Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln Leu Gln Pro Leu	
500 505 510	
GCA CCG TGC CCA AAC TCC AAA GAA TCT ATG GCA GTG TTT GAA CAG	1737
Ala Pro Cys Pro Asn Ser Lys Glu Ser Met Ala Val Phe Glu Gln	
515 520 525	
CAT TGT AAA ATG GCA CAA GAA TAT ATG AAA GTT CAA ACA GAA ATT	1782
His Cys Lys Met Ala Gln Glu Tyr Met Lys Val Gln Thr Glu Ile	
530 535 540	
GCA TTG TTA TTA CAG AGA AAG CAA GAA CTA GTT GCA GAA CTG GAC	1827
Ala Leu Leu Leu Gln Arg Lys Gln Glu Leu Val Ala Glu Leu Asp	
545 550 555	
CAG GAT GAA AAG GAC CAG CAA AAT ACA TCT CGC CTG GTA CAG GAA	1872
Gln Asp Glu Lys Asp Gln Gln Asn Thr Ser Arg Leu Val Gln Glu	
560 565 570	
CAT AAA AAG CTT TTA GAT GAA AAC AAA AGC CTT TCT ACT TAC TAC	1917
His Lys Lys Leu Leu Asp Glu Asn Lys Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr	
575 580 585	
CAG CAA TGC AAA AAA CAA CTA GAG GTC ATC AGA AGT CAG CAG CAG	1962
Gln Gln Cys Lys Lys Gln Leu Glu Val Ile Arg Ser Gln Gln Gln	
590 595 600	
AAA CGA CAA GGC ACT TCA	1980
Lys Arg Gln Gly Thr Ser	
605 606	
TGATTCTCTG GGACCGTTAC ATTTTGAAAT ATGCAAAGAA AGACTTTTTT TTTAAGGAAA	2040
GGAAAACCTT ATAATGACGA TTCATGAGTG TTAGCTTTTT GCGGTGTTCT GAATGCCAAC	2100

10/14

TGCCTATATT TGCTGCATTT TTTTCATTGT TTATTTTCCT TTTCTCATGG TGGACATACA 2160  
 ATTTTACTGT TTCATTGCAT AACATGGTAG CATCTGTGAC TTGAATGAGC AGCACTTTGC 2220  
 AACTTCAAAA CAGATGCAGT GAACTGTGGC TGTATATGCA TGCTCATTGT GTGAAGGCTA 2280  
 GCCTAACAGA ACAGGAGGTA TCAAAC TAGC TGCTATGTGC AAACAGCGTC CATTTTTTCA 2340  
 TATTAGAGGT GGAACCTCAA GAATGACTTT ATTCTTGTAT CTCATCTCAA AATATTAATA 2400  
 ATTTTTTTCC CAAAAGATGG TATATACCAA GTTAAAGACA GGGTATTATA AATTTAGAGT 2460  
 GATTGGTGGT ATATTACGGA AATACGGAAC CTTTAGGGAT AGTTCCGTGT AAGGGCTTTG 2520  
 ATGCCAGCAT CCTTGATCA GTACTGAACT CAGTTCCATC CGTAAAATAT GTAAAGGTAA 2580  
 GTGGCAGCTG CTCTATTTAA TGAAAGCAGT TTTACCGGAT TTTGTTAGAC TAAAATTGA 2640  
 TTGTGATACA TTGAACAAAA TGGAATCAT TTTTTTTTAA GGAGTAAAGA TTTTAAATTC 2700  
 TGTGATTGTG TGTATGTGTG TTGAACTGT AAAGCTTTTA TGA CTCTAAT ATTAATCTCT 2760  
 TAAATGAAAT TAAAAGGCAA AAGAACATGA TTGAGCTTAA ATGATCATTT CTTCTCGCAG 2820  
 TGATTCTTGG ATTGTTTTCT CATGTATTTG AAAAAAAAAA AAAAAA 2866

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1704

&lt;212&gt; nucleic acid

&lt;213&gt; cDNA to mRNA

&lt;400&gt; 5

ATG TCT ACA GCC TCT GCC GCC TCC TCC TCC TCC TCG TCT TCG GCC 45  
 Met Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala  
 1 5 10 15  
 GGT GAG ATG ATC GAA GCC CCT TCC CAG GTC CTC AAC TTT GAA GAG 90  
 Gly Glu Met Ile Glu Ala Pro Ser Gln Val Leu Asn Phe Glu Glu  
 20 25 30  
 ATC GAC TAC AAG GAG ATC GAG GTG GAA GAG GTT GTT GGA AGA GGA 135  
 Ile Asp Tyr Lys Glu Ile Glu Val Glu Glu Val Val Gly Arg Gly  
 35 40 45  
 GCC TTT GGA GTT GTT TGC AAA GCT AAG TGG AGA GCA AAA GAT GTT 180  
 Ala Phe Gly Val Val Cys Lys Ala Lys Trp Arg Ala Lys Asp Val  
 50 55 60  
 GCT ATT AAA CAA ATA GAA AGT GAA TCT GAG AGG AAA GCG TTT ATT 225  
 Ala Ile Lys Gln Ile Glu Ser Glu Ser Glu Arg Lys Ala Phe Ile  
 65 70 75

11/14

GTA GAG CTT CGG CAG TTA TCC CGT GTG AAC CAT CCT AAT ATT GTA	270
Val Glu Leu Arg Gln Leu Ser Arg Val Asn His Pro Asn Ile Val	
80 85 90	
AAG CTT TAT GGA GCC TGC TTG AAT CCA GTG TGT CTT GTG ATG GAA	315
Lys Leu Tyr Gly Ala Cys Leu Asn Pro Val Cys Leu Val Met Glu	
95 100 105	
TAT GCT GAA GGG GGC TCT TTA TAT AAT GTG CTG CAT GGT GCT GAA	360
Tyr Ala Glu Gly Gly Ser Leu Tyr Asn Val Leu His Gly Ala Glu	
110 115 120	
CCA TTG CCA TAT TAT ACT GCT GCC CAC GCA ATG AGT TGG TGT TTA	405
Pro Leu Pro Tyr Tyr Thr Ala Ala His Ala Met Ser Trp Cys Leu	
125 130 135	
CAG TGT TCC CAA GGA GTG GCT TAT CTT CAC AGC ATG CAA CCC AAA	450
Gln Cys Ser Gln Gly Val Ala Tyr Leu His Ser Met Gln Pro Lys	
140 145 150	
GCG CTA ATT CAC AGG GAC CTG AAA CCA CCA AAC TTA CTG CTG GTT	495
Ala Leu Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Pro Asn Leu Leu Leu Val	
155 160 165	
GCA GGG GGG ACA GTT CTA AAA ATT TGT GAT TTT GGT ACA GCC TGT	540
Ala Gly Gly Thr Val Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Thr Ala Cys	
170 175 180	
GAC ATT CAG ACA CAC ATG ACC AAT AAC AAG GGG AGT GCT GCT TGG	585
Asp Ile Gln Thr His Met Thr Asn Asn Lys Gly Ser Ala Ala Trp	
185 190 195	
ATG GCA CCT GAA GTT TTT GAA GGT AGT AAT TAC AGT GAA AAA TGT	630
Met Ala Pro Glu Val Phe Glu Gly Ser Asn Tyr Ser Glu Lys Cys	
200 205 210	
GAC GTC TTC AGC TGG GGT ATT ATT CTT TGG GAA GTG ATA ACG CGT	675
Asp Val Phe Ser Trp Gly Ile Ile Leu Trp Glu Val Ile Thr Arg	
215 220 225	
CGG AAA CCC TTT GAT GAG ATT GGT GGC CCA GCT TTC CGA ATC ATG	720
Arg Lys Pro Phe Asp Glu Ile Gly Gly Pro Ala Phe Arg Ile Met	
230 235 240	

12/14

TGG GCT GTT CAT AAT GGT ACT CGA CCA CCA CTG ATA AAA AAT TTA	765
Trp Ala Val His Asn Gly Thr Arg Pro Pro Leu Ile Lys Asn Leu	
245 250 255	
CCT AAG CCC ATT GAG AGC CTG ATG ACT CGT TGT TGG TCT AAA GAT	810
Pro Lys Pro Ile Glu Ser Leu Met Thr Arg Cys Trp Ser Lys Asp	
260 265 270	
CCT TCC CAG CGC CCT TCA ATG GAG GAA ATT GTG AAA ATA ATG ACT	855
Pro Ser Gln Arg Pro Ser Met Glu Glu Ile Val Lys Ile Met Thr	
275 280 285	
CAC TTG ATG CGG TAC TTT CCA GGA GCA GAT GAG CCA TTA CAG TAT	900
His Leu Met Arg Tyr Phe Pro Gly Ala Asp Glu Pro Leu Gln Tyr	
290 295 300	
CCT TGT CAG TAT TCA GAT GAA GGA CAG AGC AAC TCT GCC ACC AGT	945
Pro Cys Gln Tyr Ser Asp Glu Gly Gln Ser Asn Ser Ala Thr Ser	
305 310 315	
ACA GGC TCA TTC ATG GAC ATT GCT TCT ACA AAT ACG AGT AAC AAA	990
Thr Gly Ser Phe Met Asp Ile Ala Ser Thr Asn Thr Ser Asn Lys	
320 325 330	
AGT GAC ACT AAT ATG GAG CAA GTT CCT GCC ACA AAT GAT ACT ATT	1035
Ser Asp Thr Asn Met Glu Gln Val Pro Ala Thr Asn Asp Thr Ile	
335 340 345	
AAG CGC TTA GAA TCA AAA TTG TTG AAA AAT CAG GCA AAG CAA CAG	1080
Lys Arg Leu Glu Ser Lys Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Gln Gln	
350 355 360	
AGT GAA TCT GGA CGT TTA AGC TTG GGA GCC TCC CGT GGG AGC AGT	1125
Ser Glu Ser Gly Arg Leu Ser Leu Gly Ala Ser Arg Gly Ser Ser	
365 370 375	
GTG GAG AGC TTG CCC CCA ACC TCT GAG GGC AAG AGG ATG AGT GCT	1170
Val Glu Ser Leu Pro Pro Thr Ser Glu Gly Lys Arg Met Ser Ala	
380 385 390	
GAC ATG TCT GAA ATA GAA GCT AGG ATC GCC GCA ACC ACA GCC TAT	1215
Asp Met Ser Glu Ile Glu Ala Arg Ile Ala Ala Thr Thr Ala Tyr	
395 400 405	

13/14

TCC AAG CCT AAA CGG GGC CAC CGT AAA ACT GCT TCA TTT GGC AAC	1260
Ser Lys Pro Lys Arg Gly His Arg Lys Thr Ala Ser Phe Gly Asn	
410 415 420	
ATT CTG GAT GTC CCT GAG ATC GTC ATA TCA GGC AAC GGA CAG CCA	1305
Ile Leu Asp Val Pro Glu Ile Val Ile Ser Gly Asn Gly Gln Pro	
425 430 435	
AGA CGT AGA TCC ATC CAA GAC TTG ACT GTA ACT GGA ACA GAA CCT	1350
Arg Arg Arg Ser Ile Gln Asp Leu Thr Val Thr Gly Thr Glu Pro	
440 445 450	
GGT CAG GTG AGC AGT AGG TCA TCC AGT CCC AGT GTC AGA ATG ATT	1395
Gly Gln Val Ser Ser Arg Ser Ser Ser Pro Ser Val Arg Met Ile	
455 460 465	
ACT ACC TCA GGA CCA ACC TCA GAA AAG CCA ACT CGA AGT CAT CCA	1440
Thr Thr Ser Gly Pro Thr Ser Glu Lys Pro Thr Arg Ser His Pro	
470 475 480	
TGG ACC CCT GAT GAT TCC ACA GAT ACC AAT GGA TCA GAT AAC TCC	1485
Trp Thr Pro Asp Asp Ser Thr Asp Thr Asn Gly Ser Asp Asn Ser	
485 490 495	
ATC CCA ATG GCT TAT CTT ACA CTG GAT CAC CAA CTA CAG CAA GAA	1530
Ile Pro Met Ala Tyr Leu Thr Leu Asp His Gln Leu Gln Gln Glu	
500 505 510	
CTA GTT GCA GAA CTG GAC CAG GAT GAA AAG GAC CAG CAA AAT ACA	1575
Leu Val Ala Glu Leu Asp Gln Asp Glu Lys Asp Gln Gln Asn Thr	
515 520 525	
TCT CGC CTG GTA CAG GAA CAT AAA AAG CTT TTA GAT GAA AAC AAA	1620
Ser Arg Leu Val Gln Glu His Lys Lys Leu Leu Asp Glu Asn Lys	
530 535 540	
GGC CTT TCT ACT TAC TAC CAG CAA TGC AAA AAA CAA CTA GAG GTC	1665
Gly Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Gln Cys Lys Lys Gln Leu Glu Val	
545 550 555	
ATC AGA AGT CAG CAG CAG AAA CGA CAA GGC ACT TCA TGA	1704
Ile Arg Ser Gln Gln Gln Lys Arg Gln Gly Thr Ser	
560 565 567	

<210> 6

<211> 30

<212> nucleic acid

<213> other nucleic acid (Synthesized primer)

<400> 6

TTCCAAGCTT ATGGCGGCGC AGAGGAGGAG

30

<210> 7

<211> 30

<212> nucleic acid

<213> other nucleic acid (Synthesized primer)

<400> 7

TCCGGAATTC CTACGGTGCT GTCACCACGC

30



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00422

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/52, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/53, G01N33/566, A61K38/43

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/52, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/53, G01N33/566, A61K38/43

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Hiroaki et al., "TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1 Stimulates NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase-Independent Mechanism" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (1998) VOL. 243, No. 2, p.545-549	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 21 April, 1999 (21. 04. 99)

Date of mailing of the international search report  
 11 May, 1999 (11. 05. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/00422

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>8</sup> C12N15/52, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/53, G01N33/566,  
A61K38/43

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>8</sup> C12N15/52, C12Q1/68, C12Q1/02, G01N33/53, G01N33/566,  
A61K38/43

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Hiroaki et al. "TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1 Stimulates NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase-Independent Mechanism" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS (1998) VOL. 243, No. 2, p. 545-549	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.04.99

国際調査報告の発送日

11.05.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

9637